

BIOFUNKTIONALISIERUNG VON IMPLANTAT-
MODELLOBERFLÄCHEN MIT WACHSTUMSFAKTOREN
UND ADHÄSIONSPROTEINEN

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

M. Sc. Volker Ettelt

INSTITUT FÜR ANORGANISCHE CHEMIE
DER UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2014 bis August 2017 im Rahmen einer kooperativen Promotion in den Arbeitskreisen von Prof. Dr. M. Epple und Prof. Dr. M. Veith erstellt. Die experimentellen Arbeiten wurden an der Westfälischen Hochschule am Standort Recklinghausen durchgeführt.

Tag der Disputation:

18. April 2018

Gutachter:

Prof. Dr. Matthias Epple

Prof. Dr. Michael Veith

Vorsitzende:

PD Dr. Ursula Telgheder

„Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen, ein Ozean.“

ISAAC NEWTON

Darum: „Sei nicht klug in deinen Augen ...“

SALOMO

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | Biofunktionalisierung von Implantatoberflächen..... | 2 |
| 1.2 | Zielsetzung | 5 |
| 2 | GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG..... | 7 |
| 2.1 | Wachstumsfaktoren und Biofunktionalisierung..... | 7 |
| 2.1.1 | BMP-2..... | 7 |
| 2.1.2 | Schnittstelle zwischen epitheliale Gewebe und einem Implantat | 13 |
| 2.1.3 | Fibroblast-Growth-Factor-2 | 13 |
| 2.1.4 | Funktionalisierung von Calciumphosphaten..... | 15 |
| 2.2 | Experimentelle Methoden | 22 |
| 2.2.1 | Oberflächenplasmonen-Spektroskopie | 22 |
| 2.2.2 | Oberflächenplasmonen-Fluoreszenz-Spektroskopie | 27 |
| 2.2.3 | Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie..... | 29 |
| 2.2.4 | Ellipsometrie | 35 |
| 2.2.5 | UV-VIS-Spektroskopie | 37 |
| 2.2.6 | Rasterelektronenmikroskopie..... | 38 |
| 2.2.7 | Rasterkraftmikroskopie | 40 |
| 2.2.8 | Massenspektrometrie | 41 |
| 2.2.9 | Kontaktwinkelmessungen..... | 43 |
| 2.2.10 | Röntgenphotoelektronenspektroskopie | 44 |
| 2.2.11 | Biotinylierung von Proteinen..... | 45 |
| 2.2.12 | Bestimmung des Biotinylierungsgrades | 47 |
| 2.2.13 | SDS-PAGE | 48 |
| 2.2.14 | Western Blot | 49 |
| 2.2.15 | Proteinverdau | 49 |
| 3 | EXPERIMENTELLER TEIL | 51 |
| 3.1 | Präparation von TiO _x -biofunktionalisierten Modelloberflächen..... | 51 |
| 3.1.1 | Präparation und Charakterisierung von TiO _x -Modelloberflächen..... | 51 |
| 3.1.2 | Silanisierung, Biotinylierung und Chemisorption von Streptavidin auf TiO _x | 56 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2 | Eigenschaften des molekularen Schichtsystems..... | 57 |
| 3.2.1 | Unterdrückung nicht-spezifischer Proteinadsorption | 57 |
| 3.2.2 | Unterdrückung nicht-spezifischer und spezifischer Adsorption von Bakterien | 58 |
| 3.2.3 | Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau..... | 60 |
| 3.3 | Anbindung osteoinduktiver Wachstumsfaktoren..... | 62 |
| 3.3.1 | Biotinylierung von BMP-2, BMP-2/6 und Fibronektin..... | 62 |
| 3.3.2 | Nachweis und Analyse der Biotinylierung | 63 |
| 3.3.3 | Immobilisierung von bBMP-2 und bBMP-2/6 auf das molekulare Schichtsystem .. | 66 |
| 3.3.4 | Effekte von immobilisierten Wachstumsfaktoren auf humane Osteoblasten..... | 70 |
| 3.4 | Simulation einer Schnittstelle zwischen Gingiva und Implantat | 74 |
| 3.4.1 | Simulation der Biotinylierung von FGF-2 an Aminogruppen | 74 |
| 3.4.2 | Biotinylierung von FGF-2 in Anwesenheit von Heparin..... | 74 |
| 3.4.3 | Biotinylierung von FGF-2 ohne Heparin..... | 75 |
| 3.4.4 | Biotinylierung von Heparin..... | 76 |
| 3.4.5 | Immobilisierung von bFGF-2 auf das molekulare Schichtsystem | 77 |
| 3.4.6 | Effekte von immobilisiertem bFGF-2 auf humane Fibroblasten | 79 |
| 3.5 | Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat-Modelloberflächen..... | 82 |
| 3.5.1 | Charakterisierung ultradünner Calciumphosphat-Modelloberflächen..... | 82 |
| 3.5.2 | Stabilität ultradünner Calciumphosphat-Schichten in verschiedenen Lösungsmitteln..... | 85 |
| 3.5.3 | Adsorption von Streptavidin auf TiO _x in verschiedenen Lösungsmitteln..... | 86 |
| 3.5.4 | Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat..... | 87 |
| 3.5.5 | Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat mit einer Silikat-Schicht.. | 89 |
| 4 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION..... | 91 |
| 4.1 | Charakterisierung und Biofunktionalisierung von TiO_x-Modelloberflächen..... | 91 |
| 4.1.1 | Charakterisierung von TiO _x -Modelloberflächen | 91 |
| 4.1.2 | Silanisierung, Biotinylierung und Chemisorption von Streptavidin auf TiO _x | 92 |
| 4.2 | Eigenschaften des molekularen Schichtsystems..... | 99 |
| 4.2.1 | Unterdrückung nicht-spezifischer Proteinadsorption | 99 |
| 4.2.2 | Unterdrückung nicht-spezifischer und spezifischer Adsorption von Bakterien | 103 |
| 4.2.3 | Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau..... | 112 |
| 4.3 | Anbindung osteoinduktiver Wachstumsfaktoren..... | 115 |
| 4.3.1 | Simulation der Biotinylierung von BMP-2 und BMP-2/6..... | 115 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.3.2 | Analyse der Biotinylierung | 126 |
| 4.3.3 | Immobilisierung von bBMP-2 und bBMP-2/6 auf das molekulare Schichtsystem | 130 |
| 4.3.4 | Duale Biofunktionalisierung mit bBMP und bFn | 140 |
| 4.3.5 | Auswirkungen multifunktionalisierter Oberflächen auf humane Osteoblasten..... | 146 |
| 4.4 | Simulation einer Schnittstelle zwischen Gingiva und Implantat..... | 153 |
| 4.4.1 | Biotinylierung eines FGF-2 –Heparin-Komplexes | 153 |
| 4.4.2 | Immobilisierung von bFGF-2 auf dem molekularen Schichtsystem | 162 |
| 4.4.3 | Effekte von immobilisiertem bFGF-2 auf humane Fibroblasten | 168 |
| 4.5 | Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat-Modelloberflächen..... | 174 |
| 4.5.1 | Charakterisierung ultradünner Calciumphosphat-Modelloberflächen | 174 |
| 4.5.2 | Stabilität ultradünner Calciumphosphat-Schichten in verschiedenen Lösungsmitteln | 179 |
| 4.5.3 | Adsorption von Streptavidin auf TiO _x in verschiedenen Lösungsmitteln | 187 |
| 4.5.4 | Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat | 196 |
| 4.5.5 | Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat mit einer Silikat-Schicht | 209 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 219 |
| 6 | LITERATUR | 223 |
| | Publikationen | 239 |
| | Lebenslauf | 240 |
| | Danksagung..... | 241 |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | 243 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|--|
| λ | Wellenlänge |
| AFM | engl. <i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie |
| AHAPTMS | N-6-Aminoethyl-(aminopropyltrimethoxysilan) |
| ALP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| APTES | Aminopropyltrimethoxysilan |
| AS | Aminosäure |
| BMP | engl. <i>bone morphogenetic protein</i> , knochenmorphogenetisches Protein |
| BMP-2/bBMP-2 | engl. <i>bone morphogenetic protein 2</i> / biotinyliertes BMP-2 |
| BMP-2/6/bBMP-2/6 | Heterodimeres <i>bone morphogenetic protein 2</i> und <i>bone morphogenetic protein 6</i> / biotinyliertes BMP-2/6 |
| BMPR | BMP-Rezeptor |
| BSA | engl. <i>bovines serum albumin</i> , Rinderserum-Albumin |
| bTiO _x | TiO _x -Modellschicht mit biotinyliertem Aminosilan |
| CaP/bCaP | Calciumphosphat/ biotinyliertes Calciumphosphat |
| CFU | engl. <i>colony forming units</i> , koloniebildende Einheiten |
| DMEM | engl. <i>dulbecco's modified eagle medium</i> , Zellkulturmedium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOL | engl. <i>degree of labelling</i> , Biotinylierungsgrad |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid |
| EPS | extrapolymere Substanzen von Bakterien |
| ESEM | engl. <i>environmental scanning electron microscopy</i> |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FGF-2 | engl. <i>fibroblast growth factor 2</i> |
| FGFR-1 | FGF-Rezeptor 1 |
| FIR | fernes Infrarot |
| Fn/bFn | Fibronektin / biotinyliertes Fibronektin |

| | |
|--------------|---|
| FT | Fourier-Transform |
| FTIR | Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-dehydrogenase |
| GF | engl. <i>growth factor</i> , Wachstumsfaktor |
| HABA | 4'-Hydroxyazobenzen-2-carboxylsäure |
| HAp | Hydroxylapatit |
| Hep/bHep | Heparin / biotinyliertes Heparin |
| HMW | engl. <i>high molecular weight</i> , hohes Molekulargewicht |
| HRP | engl. <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| IRRAS | Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie |
| LMW | engl. <i>low molecular weight</i> , niedriges Molekulargewicht |
| MALDI-TOF-MS | engl. <i>matrix assisted laser desorptions ionization-time of flight-mass spectrometry</i> , matrixunterstützte Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MIR | mittleres Infrarot |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| NIR | nahes Infrarot |
| OCN | Osteocalcin |
| OCP | Octacalciumphosphat |
| OSN | Osteonektin |
| PBS | engl. <i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphatpuffer |
| PCR | engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Poly(ethylenglykol) |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qRT-PCR | engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion |
| REM | Rasterelektronenmikroskopie |
| Rf | engl. <i>radio frequency</i> , Hochfrequenz |
| RGD | Sequenz der Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure |

| | |
|------------------|---|
| rhBMP-2 | rekombinant-humas BMP-2 |
| RMS | engl. <i>root mean square</i> , Quadratwurzel des Mittelwerts |
| RMSD | engl. <i>root mean square deviation</i> , Abweichung von der Quadratwurzel des Mittelwerts |
| rpm | engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RSA | engl. <i>relative accessible surface area</i> ; relative, durch das Lösungsmittel zugängliche Oberfläche |
| SAM | engl. <i>self-assembled monolayer</i> , selbstorganisierte Monolage |
| SAv | Streptavidin |
| SBF | engl. <i>simulated body fluid</i> , simulierte Körperflüssigkeit |
| Secm | engl. <i>standard cubic centimeter per minute</i> , Maß für den Gastransport durch eine Gasleitung |
| SD | engl. <i>surface density</i> , Oberflächendichte |
| SDS-PAGE | engl. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gelelectrophoresis</i> , Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SEMPA | Rastertransmissionselektronenmikroskopie mit Polarisationsanalyse |
| SFGF-2 | solubilisiertes FGF-2 |
| SPR | engl. <i>surface plasmon resonance</i> , Oberflächenplasmonenresonanz |
| STEM | Rastertransmissionselektronenmikroskopie |
| Strep-HRP | engl. <i>streptavidin horseradish peroxidase</i> , Streptavidin-Meerrettichperoxidase |
| TBS | engl. <i>Tris-buffered saline</i> , Tris-Pufferlösung |
| TBST | engl. <i>Tris-buffered saline with Tween20</i> , Tris-Pufferlösung mit Tween20 |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskopie |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin |
| TEOS | Tetraethylorthosilikat |
| TiO _x | Titanoxid |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| XPS | engl. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> , Röntgenphotoelektronenspektroskopie |

1 EINLEITUNG

Titan ist bereits seit vielen Jahren als biokompatibles Material für medizinische Implantate etabliert.⁽¹⁾ Dieser Bereich umfasst neben dentalen Implantaten auch Rekonstruktionsimplantate zur Behandlung großflächiger Schädeldefekte sowie Gelenk- und Knochenimplantate in der Unfallchirurgie. Trotz der allgemein breiten Akzeptanz und erfolgreichen Integration solcher Implantate bei gesunden Patienten bleiben Risikogruppen zurück, bei denen die Integration eines Implantats aufgrund verschiedener Faktoren einer deutlich schlechteren Prognose gegenübersteht.⁽²⁾ Zu solchen Faktoren zählen intensives Rauchen,^{(3),(4)} Anfälligkeit für entzündliche Erkrankungen und eine schlechte gesundheitliche Konstitution. Bei dieser Gruppe, die ca. 6 % der Implantatpatienten ausmacht, kommt es teilweise zu schwerwiegenden Komplikationen, die oft zum Implantatverlust innerhalb weniger Monate führen.⁽⁵⁾ Dies gilt vor allem für dentale Implantate.⁽⁶⁾

Im Bereich der großflächigen knöchernen Rekonstruktion, beispielsweise bei Defekten in der Schädelplatte oder Kieferrekonstruktionen, ist die Problematik anders gelagert: Solche Implantate sind einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt und essentiell zur Stabilisierung und zum Schutz empfindlicher Gewebe. Hier ist von Anfang an eine hohe Stabilität erforderlich, die auch frühe Belastungsvorgänge kompensieren kann.

Aus diesen Gründen ist der Bedarf an Implantaten gewachsen, die nicht allein Biokompatibilität aufweisen, sondern zusätzlich das Einwachsen osteoblastärer Zellen fördern (Osteokonduktivität). Diese Zellen sind dann in der Lage, durch eine lokale Veränderung der Konzentrationen von Calcium und Phosphat Knochenmasse aufzubauen. Die Osteokonduktivität kann erheblich gesteigert werden, indem die Adhäsion osteoblastärer Zellen begünstigt wird.⁽⁷⁾ Dies kann durch Modifikationen der Topographie der Oberfläche, durch Beschichtung mit Calciumphosphaten (CaP) sowie durch Adhäsionsmoleküle erreicht werden.⁽⁸⁾ Durch eine Beschichtung mit Wachstumsfaktoren ist es sogar möglich, Implantate osteoinduktiv zu machen. Osteoinduktivität ist die Fähigkeit, *de novo* die Differenzierung osteoblastärer Vorläuferzellen zu Osteoblasten zu induzieren. Damit verbunden ist eine direkte

Stimulation der Osteosynthese. Dies kann insbesondere durch den Einsatz des knochenmorphogenetischen Wachstumsfaktors (BMP-2) erreicht werden.

Trotz der Vielzahl innovativer Ansätzen auf diesem Gebiet ist der Zeitraum zwischen Implantation und Belastbarkeit weiterhin für einen Großteil der genannten Applikationen zu lang. Darüber hinaus besteht für viele Implantate, die mit mehreren Gewebetypen in Kontakt kommen, oft nur eine verbesserte Adhäsion für einen Gewebetyp. Exemplarisch seien hier Dentalimplantate genannt, bei denen trotz guter Integration in den Knochen oft ein periimplantärer Spalt zwischen Gingiva und Implantat besteht.⁽⁹⁾ Dies begünstigt auch bei einer mikrobiologisch intakten Mundflora die Einwanderung von Bakterien in diesen Spalt.^{(10),(11)} Daraus wiederum entstehen häufig Entzündungsprozesse, die teils einen so schwerwiegenden Verlauf haben, dass nur eine Entfernung des Implantats Abhilfe schafft.⁽¹²⁾

Es besteht offensichtlich der Bedarf, medizinische Implantate multifunktional so zu modifizieren, dass eine schnelle Integration in die umliegenden Gewebe und die damit einhergehende Sekundärstabilität gewährleistet werden können, während gleichzeitig die bakterielle Besiedlung durch Schließung des postimplantären gingivalen Spaltes unterdrückt wird. Dazu ist es nötig, die an der Grenzfläche zwischen Implantat und umgebendem Medium ablaufenden biologischen Prozesse zu verstehen und bei der Wahl einer geeigneten Biofunktionalisierungsstrategie zu berücksichtigen. Diese Prozesse sollen nachfolgend kurz skizziert und daraus die für diese Arbeit relevanten Fragestellungen abgeleitet werden.

1.1 Biofunktionalisierung von Implantatoberflächen

Die Prozesse an einer Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe werden im Detail durch die Oberflächenbeschaffenheit eines Implantats bestimmt, prinzipiell finden aber folgende Interaktionen statt:⁽¹³⁾

- I) Wassermoleküle lagern sich an.
- II) Hydratisierten Ionen lagern sich an.
- III) Plasmaproteine adsorbieren unspezifisch auf die hydratisierte, geladene Oberfläche.
- IV) Zellen adhären über Wechselwirkung ihrer Integrinrezeptoren mit dem unspezifischen Proteinlayer auf der Oberfläche.

- V) Osteoblasten synthetisieren die extrazelluläre Matrix, die nachfolgend kalzifiziert wird.

Eine unspezifische Proteinlage auf der Oberfläche ermöglicht zwar die Adhäsion endogener Zellen, begünstigt jedoch auch die Adsorption von Bakterien.⁽¹⁴⁾ Bei der Biofunktionalisierung einer Implantatoberfläche muss daher bedacht werden, dass jegliche auf der Oberfläche adsorbierten Moleküle *in vivo* von einer unspezifischen Proteinmischschicht überdeckt werden können. Folglich ist eine grundlegend anti-adhäsive Biofunktionalisierung notwendig, um eine unspezifische Protein- und Bakterienadsorption zu verhindern (Abb. 1-1). Dies kann durch eine physikalische Oberflächenmodifikation (Erniedrigung der Oberflächenrauigkeit⁽¹⁵⁾) nicht erreicht werden. Eine differenziertere Biofunktionalisierung ist daher seit geraumer Zeit ein erklärtes Ziel in der Biomaterialforschung.

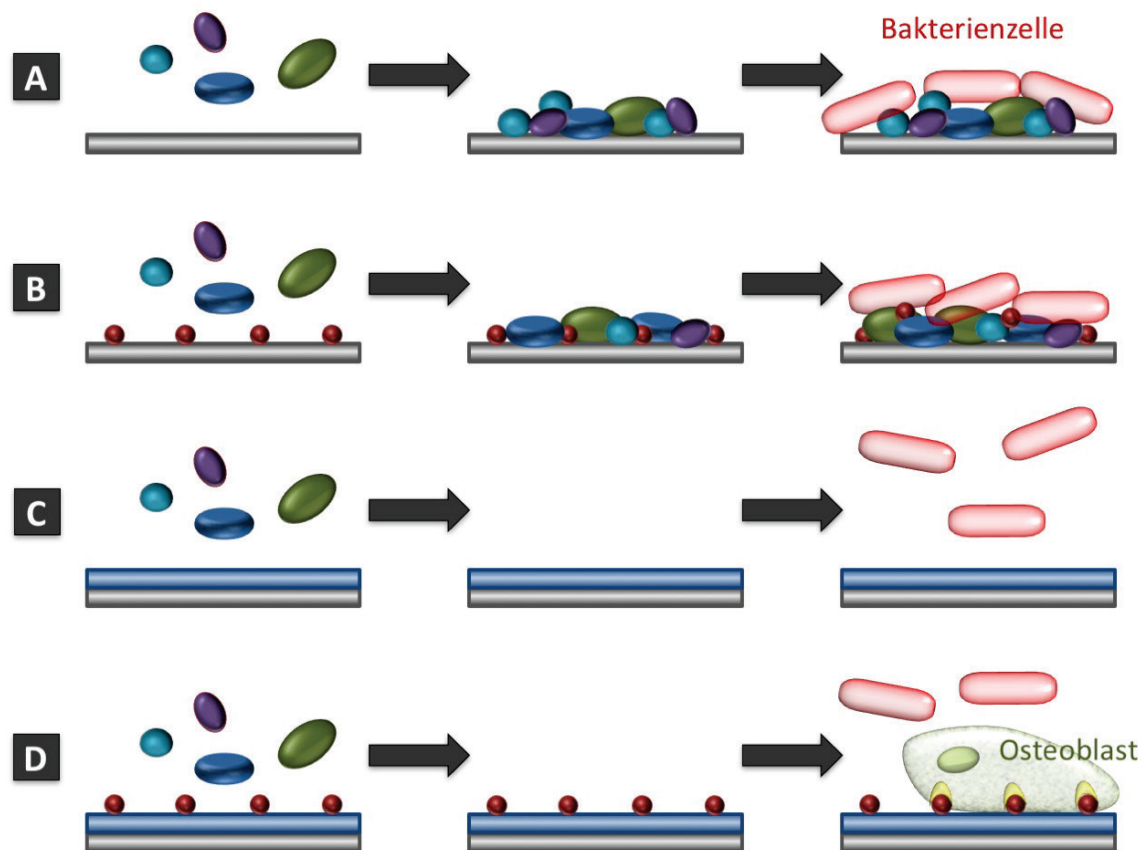


Abb. 1-1: Grenzflächenprozesse an einer unbeschichteten TiO_x -Oberfläche (A) und verschiedenen Biofunktionalisierungsstrategien (B)-(D). An unbeschichteten Titanoberflächen (A) kommt es nach der Implantation zur Adsorption einer unspezifischen Proteinmischschicht, an die Zellen und Bakterien unspezifisch adhären. Wird auf die Titanoberfläche ein Biomolekül unspezifisch physisorbiert (B), wird es ebenso von einer Proteinmischschicht überlagert und seine Wirkung dadurch verhindert. Werden Titanoberflächen antiadhäsiv funktionalisiert, so wird die unspezifische Adsorption sowohl von Proteinen, Bakterien als auch Zellen unterdrückt (C). Werden an diese antiadhäsive Funktionalisierung der Oberfläche spezifisch Biomoleküle gekoppelt (D), so kann entsprechend der Wirkung des Biomoleküls eine Stimulation von Zellen erfolgen.

Über spezifisch an eine antiadhäsive Biofunktionalisierung adsorbierte Biomoleküle können die gewünschten Zelltypen selektiv adhäreren und stimuliert werden. Dieser multifunktionale Ansatz ist bisher nur in Verbindung mit Poly(ethylenglykol)-(PEG-)biofunktionalisierten Oberflächen untersucht worden. Die Kopplung empfindlicher Proteine an eine PEG-Schicht birgt aber z. B. in Hinblick auf die biologische Aktivität eines Wachstumsfaktors große Herausforderungen (siehe Abschnitt 2.1.1). Als Alternative zur kovalenten Kopplung oder Physisorption von Proteinen auf Implantatoberflächen wurde in dieser Arbeit das aus der Biosensorik bekannte molekulare Biotin-Streptavidin-Schichtsystem adaptiert und auf der Grundlage von Vorarbeiten der AG Biophysik (Prof. Dr. M. Veith) erweitert.^{(16)–(22)}

Die Biofunktionalisierung mit diesem System kann grob in folgende Schritte unterteilt werden:

- I) Aminoaktivierung einer Implantatoberfläche über Chemisorption eines Aminosilans
- II) Kovalente Kopplung eines Biotinderivates an die Aminogruppen
- III) Adsorption einer Streptavidinmonolage
- IV) Adsorption biotinylierter Proteine

In Schritt I) hydrolysieren Organosilane in der Lösung und kondensieren mit Hydroxylgruppen auf der Oberfläche und untereinander. So bindet ein Monolayer von Organosilanen auf der Oberfläche. Je nach funktioneller Kopfgruppe des Silans kann in Schritt II) durch einen nukleophilen Angriff kovalent ein reaktives Biotinderivat beliebiger Länge gekoppelt werden. Befinden sich die Biotingruppen in ausreichender Dichte auf der Oberfläche, kann ein dicht gepackter Streptavidinmonolayer daran gebunden werden,⁽²²⁾ wobei nur spezifisch gebundenes Streptavidin auf der Oberfläche verbleibt (Abb. 1-2). Über Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte wird das Biotin in einer der vier Bindungstaschen des Streptavidins gebunden. Dies resultiert in der hohen Bindungsaffinität von Biotin zu Streptavidin (10^{15} M^{-1} in Lösung), wodurch diese zur der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindung zählt. Ein Streptavidinmonolayer auf einer Oberfläche besitzt demnach noch zwei weitere Bindungstaschen pro Streptavidin, an die biotinylierte Moleküle quasi-kovalent immobilisiert werden können.⁽¹⁸⁾

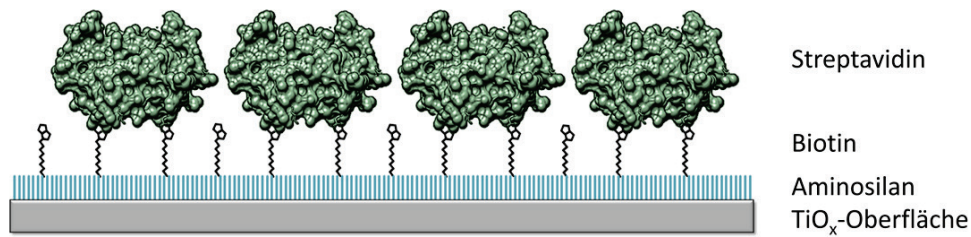


Abb. 1-2: Aufbau eines Streptavidinmonolayers auf einer mit Biotin aktivierten Titanoberfläche.

Dieses System kann nach dem Baukastenprinzip beliebig mit Biomolekülen modifiziert werden. Durch den Streptavidinmonolayer werden unspezifische Adsorptionsprozesse an der Grenzfläche unterdrückt.⁽²¹⁾ Die Biotinylierung der zu immobilisierenden Zielproteine kann individuell auf jedes Protein abgestimmt werden und geht daher nicht mit einem biologischen Aktivitätsverlust einher. Prinzipiell ist dieses System auch nicht auf Titanimplantatoberflächen beschränkt.

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung von Titandioxid-Oberflächen für eine breite Anwendung in der Implantologie mittels einer Biofunktionalisierung, die auf Biotin-Streptavidin-Interaktionen basiert. Dabei sollten vier Herausforderungen der Implantologie adressiert werden:

- I) Unterdrückung der bakteriellen Besiedlung des Implantats
- II) Schnelle und stabile Integration in das Knochengewebe
- III) Frühzeitige Schließung des postimplantären Spalts zwischen Gingiva und Implantat
- IV) Übertragungsmöglichkeit auf andere Oberflächen als Titandioxid, z. B. Calciumphosphat (CaP)

Um Anforderung I) zu erfüllen, sollte eine Methode entwickelt werden, bei der einerseits die Adsorption von Bakterien selektiv unterdrückt wird, während andererseits die spezifische Adhäsion körpereigener Zellen gewährleistet ist. Dazu sollten die antiadhäsiven Charakteristika des Streptavidinmonolayers eingehend an physiologischen Konzentrationen relevanter Proteine und Bakterien mit verschiedenen Adhäsionsmechanismen untersucht werden.

Um II) und III) zu realisieren, sind die Modelloberflächen zelltypspezifisch zu biofunktionalisieren. Dies sollte mit entsprechenden knochenmorphogenetischen Wachstumsfaktoren (BMP-2, BMP-2/6) und einem Wachstumsfaktor für epitheliales Gewebe (FGF-2) geschehen. Da die meisten Regenerations- und Heilungsprozesse eine Kombination und eine zeitlich aufeinander abgestimmte Reihenfolge von Zytokinen und weiteren Signalmolekülen erfordern,^{(23),(24)} sollte der Effekt auf Zellen bei Co-Immobilisation von verschiedenen Signalproteinen ebenfalls in diesem Rahmen untersucht werden.

Um neben primären Anwendungen im Dentalbereich weitere Gebiete der Implantologie abzudecken, musste unter IV) eine Möglichkeit geschaffen werden, die Biofunktionalisierung auch auf andere Materialien zu übertragen. Dies sollte auf Calciumphosphat-basierten Modelloberflächen getestet werden. Dabei musste insbesondere eine Lösung für die Auflösung dünner Calciumphosphat-Schichten in wässrigen Lösungen gefunden werden. Als Gesamtergebnis sollte am Ende ein multifunktionales Beschichtungssystem stehen, welches spezifisch für verschiedene Gewebetypen angepasst werden kann und nicht auf TiO_x -Oberflächen beschränkt ist.

2 GRUNDLAGEN UND STAND DER FORSCHUNG

2.1 Wachstumsfaktoren und Biofunktionalisierung

2.1.1 BMP-2

Seit der Entdeckung der osteoinduktiven Wirkung von BMP-2 im Jahre 1965⁽²⁵⁾ ist das Interesse an einer therapeutischen Nutzung dieses Wachstumsfaktors sehr hoch. Eingeschränkt durch die geringe Verfügbarkeit und fehlende Methoden zur Herstellung dauerte es Jahrzehnte, bis das humane BMP-2 rekombinant exprimiert werden konnte. Nach diesem Durchbruch konnte das Potential des Wachstumsfaktors nutzbar gemacht werden. So kam es, dass bereits im Jahr 2002 das rekombinant-humane BMP-2 (rhBMP-2) von der FDA als therapeutisches Produkt bei großen Knochendefekten zugelassen wurde.⁽²⁶⁾ Nachdem die ersten klinischen Versuche vielversprechende Ergebnisse brachten, mehrten sich sehr bald kritische Stimmen, die Nebenwirkungen durch die Applikation von BMP-2 betonten.^{(27),(28)} Vor allem durch die applizierte Menge (teilweise im mg-Bereich⁽²⁹⁾) und die Diffusionsmöglichkeit wurden gefährliche Nebenwirkungen beobachtet. Diese reichten von Entzündungsreaktionen im behandelten Gewebe, ektoper Knochenbildung und Schwellungen bis hin zur Bildung von Tumoren am Behandlungsort.⁽³⁰⁾⁽³¹⁾ So stellte sich sehr bald die Frage nach einer geeigneten Applikationsform, mit der BMP-2 kontrolliert in Bezug auf Menge, biologische Aktivität, Diffusion und räumliche Orientierung appliziert werden kann.

In dem vergangenen Jahrzehnt hat es in diesem Bereich eine Reihe von neuen Entwicklungen gegeben, mit denen der Wachstumsfaktor in der gewünschten Orientierung und in biologisch aktiver Form auf verschiedene Materialien gekoppelt werden kann.^{(32)–(34)(24)}

Grundsätzlich kann zwischen drei verschiedenen Ansätzen zur Applikation von Wachstumsfaktoren unterschieden werden: Die nicht-kovalente Adsorption von Wachstumsfaktoren, die kovalente Anbindung auf Implantatoberflächen und die lokale Abgabe mittels geeigneter Träger.^{(32)–(34)}

Die **erstgenannte Methode** wurde von Jennissen et al. geprägt und ist heute immer noch die meistgenutzte Methode.⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾ Dabei wird der Wachstumsfaktor in einer aus physiologischer Sicht hohen Konzentration zusammen mit dem Material inkubiert und physisorbiert auf der Oberfläche.⁽³⁶⁾ Der Nachweis der biologischen Aktivität findet indirekt über einen Aktivitätsassay statt.⁽³⁷⁾ Vorteil dieser Methode ist die einfache Durchführung, nachteilig sind die unphysiologisch hohen Konzentrationen und die Ungewissheit darüber, ob der Wachstumsfaktor seine volle, biologische Aktivität beibehält. Bezüglich der unphysiologisch hohen Konzentrationen gibt es begründete Bedenken zur Anwendung *in vivo*.^{(27),(38),(39)} Zudem erlaubt die Methode wenig Kontrolle über die Abgabe und Retention des Wachstumsfaktors und stößt bezüglich Kontrolle der Orientierung und der Desorptionsrate früh an ihre Grenzen.⁽³³⁾ Zur Verbesserung der Adsorption auf Implantatoberflächen wurden mehrere Verfahren entwickelt, um die Oberflächentopologie und die Zusammensetzung zu verändern. Zu den etabliertesten Verfahren zählen dabei das Säureätzverfahren, die anodische Polarisierung, das Plasmasprühen und das Sandstrahlen.⁽⁴⁰⁾

Bei der **zweiten Methode**, der kovalenten Immobilisation, gibt es ein breiteres Spektrum an Möglichkeiten, wie der Wachstumsfaktor an eine Oberfläche gebunden werden kann. Dies geschieht über einen Linker mit verschiedensten funktionellen Endgruppen.^{(33),(41)} Die kovalente Immobilisation verlängert die Bioverfügbarkeit des Wachstumsfaktors bei gleichzeitiger Reduktion der benötigten Menge und Erhöhung ihrer Stabilität. Zudem erlaubt diese Methode eine gewisse Kontrolle über die räumliche Orientierung des Wachstumsfaktors.^{(32),(33)} Der Wachstumsfaktor diffundiert nicht frei und kann daher nicht von dem Zellrezeptor internalisiert werden. Stattdessen können durch den gebundenen Wachstumsfaktor über einen längeren Zeitraum die entsprechenden Signalwege aktiviert werden. Durch kovalente Anbindung an die Oberfläche ergibt sich für die Zelle eine neue Umgebung, in der lokal eine sehr hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren exponiert wird, sodass es zu multivalenten Bindungen zwischen Rezeptor und Ligand kommen kann.^{(42),(43)} Dies hat eine verstärkte Signaltransduktion hinsichtlich der Dauer der Stimulation zur Folge. Normalerweise bauen Zellen die Signalmoleküle recht schnell wieder ab, sodass die Stimulation reduziert wird. Durch Immobilisation der Signalmoleküle ist dieser Abbau aber nicht möglich, sodass es zu dem verlängerten Stimulationseffekt kommt. Nebeneffekt dieser langanhaltenden Stimulation sind Veränderungen im Signaltransduktionsweg, die in unter-

schiedlichen Stimuli resultieren können. So berichteten Ito et al. dass bei immobilisiertem EGF statt des Wachstums (wie üblich) die Differenzierung erhöht war.⁽⁴⁴⁾ Es existieren allerdings Bedenken über eine potentielle Kanzerogenität dieser künstlichen Dauerstimulation. Bisher durchgeführte Untersuchungen konnten diese Bedenken aber nicht bestätigen.^{(33),(45)}

Die etablierteste Methode zur kovalenten Immobilisierung ist die *Carbodiimidchemie*. Dabei wird mithilfe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) eine Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe unter Ausbildung eines O-Acylurea-Intermediats zu einer Amidbindung verknüpft.⁽⁴⁶⁾ So können auf einfache und kostengünstige Weise mit einer hohen Effizienz Wachstumsfaktoren an reaktive Endgruppen gekoppelt werden. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass EDC nicht zwischen reaktiven Endgruppen wie dem N/C-Terminus und reaktiven Gruppen innerhalb des Wachstumsfaktors (z. B. Lysin) unterscheiden kann. Folglich können auch intermolekular reaktive Gruppen verknüpft werden („Crosslinking“) oder reaktive Gruppen, die eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorbindung spielen. Dies hat eine veränderte Bioaktivität des Wachstumsfaktors zur Folge.⁽⁹⁾

Die *Photoimmobilisation* von Wachstumsfaktoren ist ebenfalls eine etablierte Methode, um Wachstumsfaktoren kovalent an ein Zielmolekül zu immobilisieren. Dazu muss der Wachstumsfaktor zuerst mit einer photoreaktiven Gruppe funktionalisiert werden und kann anschließend über UV-Exposition bei einer definierten Wellenlänge an das Zielsubstrat gebunden werden.⁽⁹⁾ Durch Variation der Methode kann indirekt sogar eine Kontrolle über die Orientierung des Wachstumsfaktors gewährleistet werden.⁽⁴⁷⁾ Die Methode zeichnet sich durch ihre Einfachheit, Effektivität und Kosteneffizienz aus. Sie hat jedoch den Nachteil, dass, ähnlich wie bei der Carbodiimidchemie, alle reaktiven Gruppen im Wachstumsfaktor reagieren können. Folglich können auch ähnliche Probleme bezüglich der Konformation und Bioaktivität auftreten. Eine zusätzliche Gefahr für den Wachstumsfaktor besteht in UV-induzierten Schäden.⁽⁴⁸⁾ Mithilfe von *Acrylaten* können Wachstumsfaktoren in ein Polymernetzwerk eingebaut werden. Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung unspezifischer Bindungen des Wachstumsfaktors durch nicht-adhäsive Eigenschaften des PEG. Nachteilig ist neben den für die EDC-Chemie und Phenylazide angesprochenen Einschränkungen die Beschränkung auf acrylierte Polymere und mögliche UV-induzierte Schäden. Für die Immobilisation von Wachstumsfaktoren

an Polymere dienen häufig weitere Crosslinker, die an spezifische funktionelle Reste im Wachstumsfaktor binden können. Dazu zählen *Maleinsäureanhydridgruppen* und verschiedene *Maleimidverbindungen*.^{(48),(49)}

Über *Self-assembled Monolayer* (SAM) können Wachstumsfaktoren direkt auf die Oberfläche von Metallen wie z. B. Titan gebracht werden. Dazu wird zuerst ein Siloxan oder Phosphonsäure als Monolayer auf der Metallschicht immobilisiert. Anschließend können an deren Endgruppen Wachstumsfaktoren gekoppelt werden.^{(50),(51)} Eine weitere Methode der Oberflächenmodifikation zur Ankopplung ist das sogenannte „*Plasma Treatment*“. Dabei werden z. B. Polymere mit Allylalkohol oder Allylamin behandelt, um Hydroxyl- oder Aminogruppen in das Polymer einzubauen, an welche nachfolgend über Carbodiimidchemie Wachstumsfaktoren gekoppelt werden können.^{(32),(52)} Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine hohe Dichte an funktionellen Gruppen in das Polymer eingeführt werden kann, an die potentiell Wachstumsfaktoren binden können. Nachteile sind auch hier die Einschränkung der Bioaktivität durch intramolekulares Crosslinking der Wachstumsfaktoren untereinander und die Nichtkontrollierbarkeit der Orientierung mit den entsprechenden Einschränkungen in der Bioaktivität. Eine Kontrolle über die Orientierung ist erst durch die sogenannte „*Click-Chemie*“ realisiert worden. Dabei wird über orthogonale Schutzgruppen nur die gewünschte funktionelle Gruppe modifiziert. So können sehr spezifische reaktive Gruppen in den Wachstumsfaktor gebracht werden, die dementsprechend selektiv mit anderen Gruppen reagieren.⁽³²⁾ Großer Vorteil der Methode ist die Kontrolle über die Orientierung, auch wenn die Reaktionen im Vergleich zu etablierten Methoden wie EDC-Chemie komplexer sind. Auf diese Art und Weise konnte bereits erfolgreich BMP-2 an ein Hydrogel gekoppelt werden.⁽⁵³⁾

Wachstumsfaktoren können über *Oligonukleotide* auf eine Oberfläche immobilisiert werden.⁽⁵⁴⁾ Dazu wird an den Wachstumsfaktor ein DNA-Strang gekoppelt, welcher mit dem komplementären Strang auf der Oberfläche hybridisiert. Vorteil der Methode ist die Überwindung der Inaktivierung von Wachstumsfaktoren bei der Sterilisation von Implantaten. Nachteile ergeben sich durch ungewollte Reaktionen bei der Einführung von DNA *in vivo* oder aufwändige Versuchsabläufe. Die größte Kontrolle erreicht man über das „*genetic engineering*“ von Wachstumsfaktoren. Über gentechnische Methoden können gezielt an bestimmten Stellen „Tags“ im Protein eingeführt werden. So konnten Fusionsproteine hergestellt werden, die nur an

gewünschten Stellen eine Modifikation erhielten.^{(24),(55),(56)} Zu diesen gentechnischen Modifikationen zählen z. B. der Hexahistidin-Tag,⁽⁵⁷⁾ eine Kollagen-Bindungsdomäne,⁽⁵⁸⁾ ein konstanter Teil von Immunglobulinen,⁽⁵⁹⁾ der Cystein-Tag⁽⁵⁵⁾ oder der p-Azido-phenylalanin-Tag,⁽⁶⁰⁾ die alle nach dem gleichen Muster eine Orientierung des Wachstumsfaktors erlauben. Der große Vorteil besteht darin, dass man bei Kenntnis der wichtigen Bindungsstellen eine strukturelle Veränderung im Wachstumsfaktor vermeiden kann. Allerdings ist bei Anwendung eines Fusionsproteins immer die Gefahr vorhanden, dass die Bioaktivität herabgesetzt wird. So wurde berichtet, dass solch veränderte Wachstumsfaktoren Änderungen hinsichtlich ihrer Stabilität, Löslichkeit, Bioaktivität sowie Biospezifität erfuhren.⁽⁶¹⁾ Nachteilig ist auch der hohe Aufwand zur Produktion eines Fusionsproteins und die allgemein geringe Ausbeute.

Ein eigenes Feld eröffnet die Kopplung von *Wachstumsfaktorpeptiden*. Dabei werden bestimmte Sequenzen aus Wachstumsfaktoren mit einer der oben genannten Methoden an Oberflächen konjugiert. Über die Effektivität *in vitro* und *in vivo* herrscht nicht immer Einmütigkeit. So wurden durchaus positive Ergebnisse vergleichbar der Immobilisation des vollständigen Wachstumsfaktors berichtet,^{(62)–(64)} während auf der anderen Seite negative Ergebnisse Zweifel an der Effektivität dieser Kopplungsmethode aufkommen ließen.^{(27),(38)} In dieser Arbeit wurde der formulierte Ansatz in modifizierter Form durch *Biotinylierung von BMP-2* und Bindung an Avidin umgesetzt.^{(45),(65)}

Der **dritte große Bereich** der Applikation von Wachstumsfaktoren umfasst die Strategie, den Wachstumsfaktor geschützt in einem Trägermaterial an den gewünschten Ort zu transportieren und dort lokal freizusetzen.⁽³⁴⁾ Vorteile dieser Strategie sind die Erhaltung der Struktur des Wachstumsfaktors und Schutz vor ungewolltem enzymatischen Abbau, denn frei diffundierendes BMP wird im Körper innerhalb von einigen Minuten abgebaut.⁽⁶⁶⁾ Zudem erhofft man sich eine erhöhte Retention am Wirkungsort und eine kontrollierte Abgabe inkorporierter Wachstumsfaktoren in physiologischen Dosen.⁽³⁴⁾

Zur Einkapselung werden synthetische und natürliche Polymere verwendet, deren Freisetzungskinetik hauptsächlich vom Abbau des Trägers abhängt. Bei den synthetischen Polymeren werden Poly- α -Hydroxysäuren, Polyorthoester, Polyanhydride, Polyaminosäuren und Copolymere aus Milch- und Glykolsäure eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte bereits gezeigt werden, dass BMP-2 lange

genug zurückgehalten und in ausreichender Dosis appliziert werden kann, um einen Knochendefekt zu heilen.⁽⁶⁷⁾ Verbesserungsmöglichkeiten betreffen hier besonders noch die Bereiche der Biokompatibilität, der Einkapselungseffizienz und der Freisetzungsrates. Zudem beobachtet man häufig einen Verlust der Bioaktivität des Wachstumsfaktors.⁽³⁴⁾ Als natürliche Trägermaterialien werden z. B. Kollagen, Stärke, Hyaluronsäure, Fibrin, Chitosan, Alginat, Gelatin, Seidenproteine, Dextran und Heparin eingesetzt, um BMP-2 am Zielort freizusetzen.^{(68)–(70)} Diese Träger zeichnen sich durch ihre natürliche Proteinaffinität aus. Allerdings werden diese Trägermaterialien unter physiologischen Bedingungen schnell abgebaut, was eine schlechte Proteinretention zur Folge hat.⁽³⁴⁾ Um diesen Problemen zu begegnen, werden häufig Komposite aus synthetischen, natürlichen und anorganischen Materialien (z. B. Calciumphosphaten) hergestellt.^{(34),(71),(72)}

Schwierigkeiten und erhebliches Optimierungspotential treten bei der Steuerung der lokalen Freisetzung des Wachstumsfaktors auf. Nahezu alle Träger kämpfen mit dem Problem des „burst-effect“, bei dem ein Großteil des inkorporierten Proteins innerhalb weniger Stunden bis Tage freigesetzt wird. Daher ist es bisher noch nicht gelungen, ein effektives Applikationssystem, z. B. für BMP-2 im Menschen, zu etablieren.⁽⁷³⁾ Zwar gibt es Ansätze, sogenannte „Stimulus-responsive Carrier“ einzusetzen, bei denen der Träger auf ein externes Signal (Magnetfeld, Temperatur, pH-Shift) hin seinen Inhalt größtenteils freisetzt, aber auch hier kann der „burst-effect“ nicht verhindert werden. Zudem muss auch dann beachtet werden, dass das Material biokompatibel ist und keine Entzündungsreaktion hervorruft, während es gleichzeitig die Ansprüche für eine einfache Lagerung und Sterilisation erfüllen muss.⁽⁷⁴⁾ Ein weiterer Nachteil ist die begrenzte Beladungseffizienz des Trägers.⁽³²⁾ Momentan werden noch zu große Mengen an Wachstumsfaktoren benötigt, um eine Beladung der Träger zu gewährleisten, die einen biologischen Effekt erzielt.⁽⁷⁵⁾ Die Wechselwirkungen des Trägermaterials mit dem inkorporierten Wachstumsfaktor führen häufig zu Aggregation oder strukturellen Veränderungen des Wachstumsfaktors.⁽⁶¹⁾ Darüber hinaus sind im Blick auf eine Applikation im Menschen auch eine gewisse Praktikabilität und einfache, aber effektive Dosierung erwünscht. Dabei soll der Träger möglichst lokal, z. B. in einen Knochendefekt, gespritzt werden können. Problematisch bleibt hierbei, dass bei derartiger Applikationsform nur etwa 5 % des Proteins am gewünschten Ort verbleiben.⁽⁷⁶⁾ Die geringe Retention des Trägers am Zielort deckt einen weiteren Nachteil dieser Applikationsform für Wachstumsfaktoren auf.^{(23),(34)} Dies ist im Hinblick auf die

Potenz von Wachstumsfaktoren und die berichteten Nebeneffekte nicht tragbar.⁽⁶¹⁾ Der optimale Träger, der alle geforderten Eigenschaften in sich vereint, wurde bis heute nicht gefunden.⁽³⁴⁾

Aus den vorgestellten Applikationsformen für Wachstumsfaktoren auf Implantaten geht hervor, dass bei der Beladung mit dem Wachstumsfaktor viele Parameter zu berücksichtigen sind. Ein Lösungsansatz, bei dem diese Parameter berücksichtigt werden, bietet die Biotinylierung des Wachstumsfaktors und Ankopplung an das Biotin-Streptavidin-System.

2.1.2 Schnittstelle zwischen epithelialem Gewebe und einem Implantat

Wird ein Implantat in den Körper eingebracht, so ist der Großteil der Kontaktfläche zum Knochengewebe gerichtet. Insbesondere bei Dentalimplantaten besteht aber auch Kontakt zu gingivalem Gewebe, in dem sich hauptsächlich Fibroblasten befinden. Bei gesunden Zähnen dichtet das gingivale Gewebe, das sogenannte Saumepithel, den Bereich zwischen Zahn und Knochen gegenüber der oralen Kavität ab. Dies ist ein Schutz vor der großen Zahl an Bakterien, die sich in der Mundhöhle befindet. Bei einem Dentalimplantat ist der Bereich zwischen dem Kontakt mit dem Knochengewebe und der Exposition gegenüber der Mundflora nach Implantation ungeschützt. In dieser Phase ist die Gefahr der Einwanderung eines bakteriellen Keims aus der Mundhöhle in den periimplantären Spalt signifikant erhöht.⁽⁷⁷⁾ Um diesen Spalt so schnell wie möglich zu schließen, ist eine schnelle Einfassung des Implantats durch epitheliales Gewebe der Gingiva erforderlich. Dafür müssen die Fibroblasten am Saum des Implantats selbst stimuliert werden. Als Moleküle mit der größten Stimulationsfähigkeit gelten Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Findet diese Stimulation nicht statt, so besteht zudem die Gefahr einer fibrösen Einkapselung des Implantats.⁽⁷⁸⁾

2.1.3 Fibroblast-Growth-Factor-2

Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) umfasst nach dem heutigen Stand der Forschung 23 Proteine.⁽⁷⁹⁾ FGF-Moleküle besitzen das Potential, in Endothelzellen und Fibroblasten die Proliferation und Differenzierung zu stimulieren.⁽⁸⁰⁾ Von den verschiedenen Proteinen aus der FGF-Familie ist FGF-2 der am besten untersuchte Wachstumsfaktor. Er ist entscheidend an Geweberegenerationsprozessen beteiligt. Dazu zählen neben der Wundheilung die Angiogenese, Hämatopoese und das Wachstum von Zellen der glatten Muskulatur. Darüber

hinaus ist er an der Differenzierung von Zellen des Nervensystems, des Auges und des Skeletts beteiligt, wobei die genaue Funktion noch nicht vollständig bekannt ist.

FGF-2 existiert in *low molecular weight (LMW)* und *high molecular weight (HMW)* Isoformen mit Molekulargewichten von 18 kDa bis 34 kDa. Das HMW-FGF-2 ist im Zellkern lokalisiert und daher in der Signaltransduktion durch membranständige FGF-Rezeptoren nicht von Relevanz.⁽⁸¹⁾ Das LMW-FGF-2 befindet sich ebenfalls im Nucleus, jedoch zu einem großen Anteil auch im Zytoplasma der Zellen.⁽⁸²⁾ Von dort aus wird es in die Umgebung abgegeben. Das sekretierte FGF-2 bindet anschließend an membranständige FGF-Rezeptoren-1 (FGFR-1), die auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen (z. B. Fibroblasten) exprimiert werden. Das FGF-2 besitzt eine *high-affinity*- und eine *low-affinity*-Bindestelle für die Rezeptorbindung. An die *high-affinity*-Bindestelle binden die *high-affinity FGF-Rezeptoren*, an die *low-affinity*-Bindestelle die *low-affinity-Rezeptoren*.⁽⁸³⁾ Durch die Bindung der Rezeptoren werden in der Zelle Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, zu denen Ras-, Raf-, MAPK- und ERK-Signalwege gehören.^{(80),(84),(85)} Die *low-affinity*-Rezeptoren sind membranassoziierte Heparansulfate oder Heparin.^{(86),(87)} Diese bestehen aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Oligosacchariden aus D-Glucosaminen und Uronsäuren.⁽⁸⁸⁾ Durch ein spezifisches Sulfatierungsmuster des Heparins bzw. des Heparansulfates auf der Zelloberfläche kann die FGF-Signalisierungsaktivität auf den entsprechenden Zelltypen reguliert werden.⁽⁸⁴⁾ Die Notwendigkeit von Heparin bzw. Heparansulfat für die biologische Aktivität des FGF-2 wird in der Forschung kontrovers diskutiert.^{(87),(89)–(94)} Es ist aber bekannt, dass sie den FGF-FGFR-Komplex stabilisieren,⁽⁸⁷⁾ indem sie eine Assoziation zweier FGF-2-Moleküle an einem Rezeptor initiieren.^{(83),(95)} In Anwesenheit von Heparin wurde bei der Bindung von FGF-2 eine stärkere Signaltransduktion beobachtet als ohne Heparin.^{(95),(96)}

Für die Bindung des FGF-2 an den FGF-Rezeptor in Anwesenheit von Heparin existieren verschiedene Modelle von Schlessinger und Pellegrini, denen jeweils ein unterschiedliches stöchiometrisches Verhältnis von FGF:FGFR:Heparin (2:2:2 bzw. 2:2:1) zugrunde liegt.^{(97),(98)} In beiden Modellen stehen die beiden FGF-2-Moleküle aber nicht in direkter Wechselwirkung zueinander. Nach dem aktuellen Stand der Forschung wird das Schlessinger-Modell mit einem stöchiometrischen Verhältnis von FGF:FGFR:Heparin von 2:2:2 unter den Forschern favorisiert.⁽⁹⁹⁾

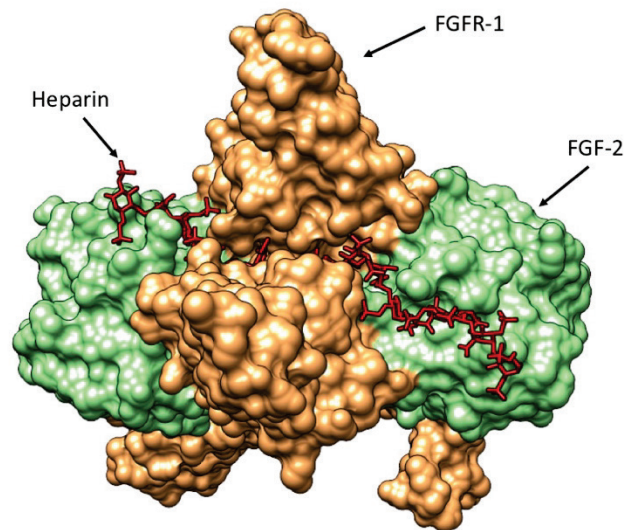


Abb. 2-1: Bindung von FGF-2 (grün) an FGFR-1 (braun) mit Heparin (rot) an der low-affinity-Bindestelle. Die Modelle nach Schlessinger und Pellegrini unterscheiden sich in der Menge des involvierten Heparins. Modelliert mit Chimera nach Schlessinger et al.⁽⁹⁷⁾

Darüber hinaus fungieren das Heparin oder Heparansulfat als Schutz des FGF-FGFR-Komplexes vor der Degradation durch spezifische Proteasen und Säure.^{(100),(101)}

2.1.4 Funktionalisierung von Calciumphosphaten

Titanimplantate sind biokompatibel, stehen aber in der Knochenregeneration weit hinter der Effektivität von autologen oder xenologen Knochentransplantaten zurück. Trotz der Biokompatibilität kommt die Implantatoberfläche zu Beginn nicht in direkten Kontakt mit dem Knochen. Die Folgen sind eine fibröse Einkapselung und eine mechanische Instabilität bis hin zum Implantatverlust.⁽¹⁰²⁾ Daher nimmt die Oberflächenmodifikation von Titanimplantaten seit einigen Jahren einen großen Bereich in der Implantatforschung ein. Dabei ist das primäre Ziel, die Implantat-Gewebeinteraktion positiv zu beeinflussen. Eine erhöhte Oberflächenrauigkeit durch Säureätzung,⁽¹⁰³⁾ Beschichtung mit Biomolekülen⁽¹⁰³⁾ oder Calciumphosphat (CaP)⁽¹⁰⁴⁾ sind verschiedene Oberflächenmodifikationen, die vielversprechende Ergebnisse zur Verbesserung der Osteokonduktivität hervorgebracht haben.

Insbesondere die Beschichtung von Implantaten mit Calciumphosphat ist aufgrund der natürlichen Osteokonduktivität von Calciumphosphat eine attraktive Methode, um eine verbesserte Adhäsion von osteoblastären Zellen zu erreichen.^{(104),(105)(106)} Die Osteokonduktivität CaP-beschichteter Implantate kommt dadurch zustande, dass sich die CaP-Schicht auflöst und wieder ausfällt. Dabei werden Kollagenmoleküle

und andere Proteine aufgenommen, und durch freie Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen wird zusätzlich die Chemotaxis stimuliert. Dadurch werden Osteoblasten rekrutiert, die eine Integration des Implantats in den Knochen beschleunigen.⁽¹⁰⁷⁾

Calciumphosphate sind schon länger im Fokus der Wirkstofftransportforschung, um als nanopartikuläre Träger Wirkstoffe im Körper zu transportieren.^{(108)–(110)} Aus diesem Forschungsbereich gibt es bereits einige Ansätze der kovalenten Modifikation von Calciumphosphaten, vornehmlich aber für die Anwendung als Nanopartikel.^{(111)(112)–(115)(116),(117)} Ansätze zur kovalenten Modifikation von Calciumphosphat für Implantate oder großflächige Knochendefekte sind bisher wenig untersucht. Der Bedarf an neuartigen und verbesserten Knochenersatzmaterialien wird in den kommenden Jahren aufgrund des demografischen Wandels weiter steigen. Materialien aus Calciumphosphat alleine weisen eine zu geringe Bruchfestigkeit auf, als dass sie die Titanimplantate verdrängen könnten. Eine Beschichtung von Titanimplantaten mit Calciumphosphat bietet wie bereits erwähnt eine Gerüststruktur für osteoblastäre Zellen und ist daher osteokonduktiv. Eine Erweiterung um eine osteoinduktive Komponente (z. B. durch Wachstumsfaktoren) würde einen signifikanten Fortschritt in der Behandlung großflächiger Defekte auch bei Risikopatienten bedeuten. Dazu existieren bereits Ansätze, bei denen Wachstumsfaktoren wie BMP-2 einfach auf der Oberfläche physisorbiert werden.^{(118),(119)} Eine kontrollierte Freisetzung ist dabei jedoch nicht möglich. Daher muss eine kovalente oder quasi-kovalente Biofunktionalisierung erfolgen, bei denen der Wachstumsfaktor nur lokal definiert verfügbar ist.

Für die Beschichtung mit Biomolekülen existieren andere Bedingungen als bei Titanimplantaten. Die kovalente Oberflächenmodifikation von Calciumphosphaten gestaltet sich aufgrund der ionischen Natur herausfordernd. Aufgrund der Anordnung der Ionen im Kristallgitter eines Calciumphosphats (z. B. Hydroxylapatit, HAp) kann keine kovalente Bindung an das Calciumphosphat erfolgen. Es wird diskutiert, ob kovalente Bindungen an die O-H-Gruppe oder PO_4^{3-} -Gruppe auf der Oberfläche des Materials möglich sind.⁽¹¹³⁾ Dazu muss das Hydroxylapatit an der Oberfläche so modifiziert werden, dass viele Hydroxylgruppen präsent sind, die weiter funktionalisiert werden können.

Zur kovalenten Modifikation ist daher eine Phase hilfreich, die anorganische und organische Phasen miteinander verbindet. Als prominenteste Moleküle mit dieser Fähigkeit gelten die Gruppen der Alkylsilikate. Alkylsilikate bilden ein Netzwerk

aus Siliziumdioxid, das an Hydroxylapatit gebunden werden kann. Der biologische Apatit besteht nicht nur aus Calcium und Phosphat,⁽¹²⁰⁾ sondern es sind auch Fremdgruppen wie z. B. Carbonate eingelagert. Diese erleichtern den Funktionalisierungsprozess mit einem Silikat, welches überwiegend elektrostatisch mit den Hydroxylgruppen von Hydroxylapatit wechselwirkt⁽¹¹³⁾ oder sogar eine kovalente oder koordinative Si-O-Bindung mit den Hydroxylgruppen an der Oberfläche eingeht.⁽¹²¹⁾ Für die weitere Funktionalisierung werden meist Alkoxysilane eingesetzt, die eine Silan-Kopfgruppe sowie am Ende ihrer Alkylkette eine funktionelle Gruppe (z. B. eine Aminogruppe) besitzen, an die weitere Moleküle gebunden werden können.

Um derartige Biofunktionalisierungsprozesse an der Calciumphosphat-Grenzfläche beobachten zu können, bedarf es einer empfindlichen Analytik. Für diese empfindliche Analytik müssen dünne Modellschichten hergestellt werden. Dazu ist es relevant, die Charakteristika der anorganischen Calciumphosphat-Komponente kurz zu skizzieren:

Die anorganischen Komponenten im Körper bestehen in der Hauptsache aus Hydroxylapatit (HAp, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$).⁽⁴⁾ Es wird zur Anwendung in medizinischen Implantaten oder Beschichtungen verwendet, da es eine hohe Biokompatibilität aufweist. Darüber hinaus existieren weitere Phasen des Calciumphosphats, die sich insbesondere im Ca/P-Verhältnis (0.5 – 2) und in ihrer Wasserlöslichkeit unterscheiden. Davon finden aber nicht alle Phasen biomedizinische Verwendung. Zudem kommen die Calciumphosphat-Phasen im Körper nicht stöchiometrisch exakt vor, d. h. es werden einige Gewichtsprozent Fremdatome- oder Molekülgruppen eingebaut. Bei Hydroxylapatit entsteht Fluorapatit durch den Einbau von Fluorid, und Carbonatapatit durch Substitution von Phosphat oder Hydroxid durch Carbonat. Diese carbonatisierte Form des Apatits kommt dem biologischen Hartgewebe chemisch und strukturell am nächsten. Weitere Phasen von Calciumphosphaten und ihre Bedeutung in der Knochenregeneration sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: Verschiedene Phasen von Calciumphosphat (CaP) und ihre biologische Bedeutung in der Biomedizin. Modifiziert nach ⁽¹²⁰⁾.

| Verbindung | Summenformel | Molares Ca/P-Verhältnis | Löslichkeitsprodukt | Biomedizinische Relevanz |
|---|---|-------------------------|---------------------|---|
| Monocalciumphosphat-Monohydrat (MCPM) | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0.5 | 1.14 | |
| Monocalciumphosphat-Anhydrit (MCPA) | $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ | 0.5 | 1.14 | |
| Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD, Brushit) | $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 1.0 | 6.59 | Pathologische Verkalkungen |
| Dicalciumphosphat-Anhydrit (DCPA, Monetit) | CaHPO_4 | 1.0 | 6.9 | Zusatz in CaP-Zementen |
| Octacalciumphosphat (OCP) | $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 1.33 | 96.6 | Pathologische Verkalkung |
| α -Tricalciumphosphat (α -TCP) | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 1.5 | 25.5 | Zusatz in CaP-Zementen |
| β -Tricalciumphosphat (β -TCP) | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 1.5 | 28.9 | Pathologische Verkalkung, Knochenersatzmaterial |
| Amorphes Calciumphosphat (ACP) | $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$ | 1.2 – 2.5 | 25 | Pathologische, Verkalkung Knochenersatzmaterial |
| Calcium-defizitärer Hydroxylapatit (CDHA) | $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ | 1.5 – 1.67 | 85 | Knochenzement |
| Hydroxylapatit (HAp) | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | 1.67 | 116.8 | Knochenersatzmaterial |
| Tetracalciumphosphat (TTCP) | $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ | 2.0 | 38 – 44 | Knochenzement |

Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Phasen des CaP ist über Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie (FTIR) und Röntgenbeugung möglich (Abb. 2-2). Die Form der Banden im IR gibt Aufschluss über die Kristallinität und Phase, ebenso die verschiedenen Reflexe in der Röntgenbeugung.⁽¹²²⁾

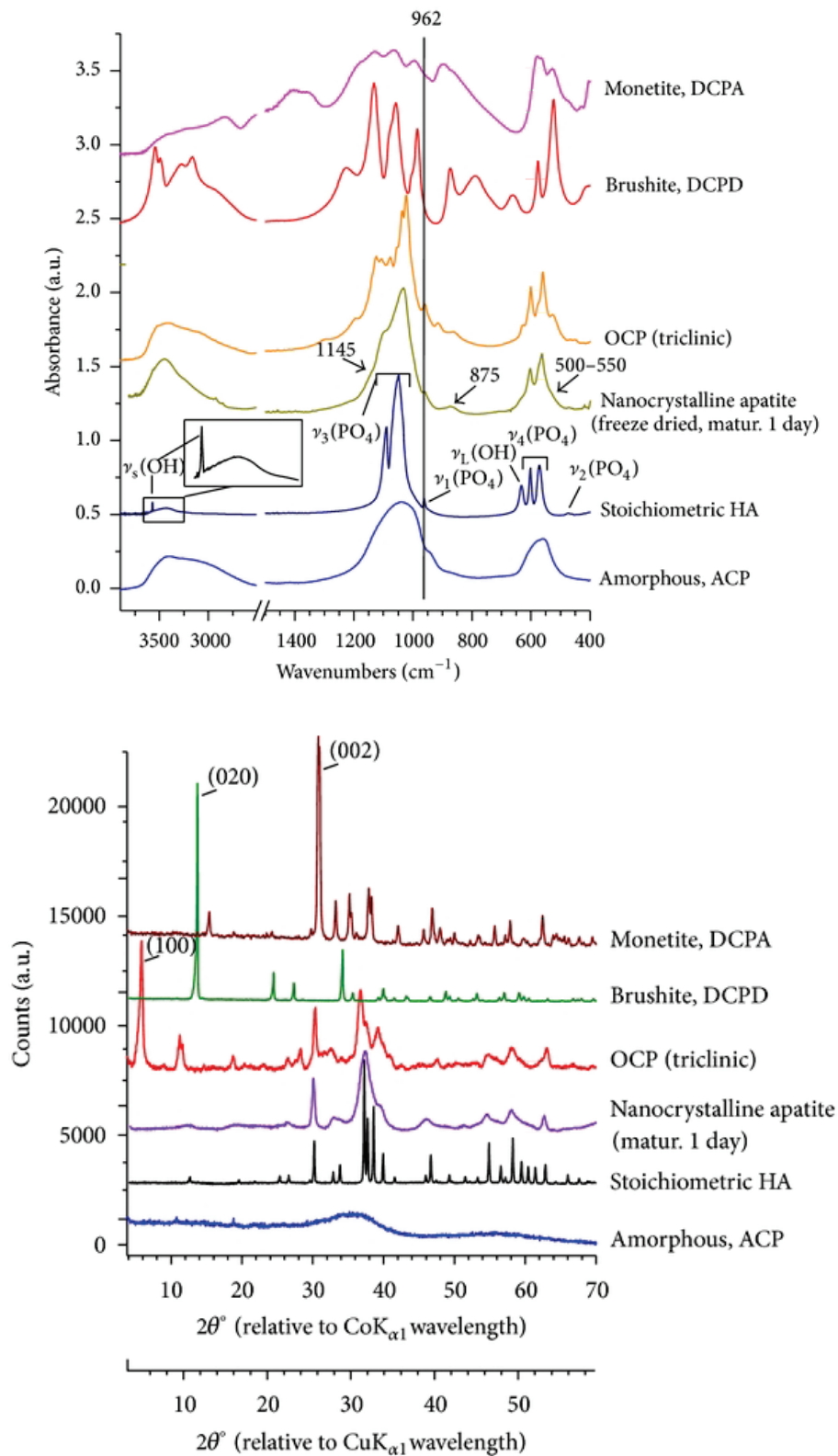


Abb. 2-2: Verschiedene Formen von CaP ergeben spezielle FTIR-Banden und charakteristische Reflexe in der Röntgenkristallografie.⁽¹²²⁾

Mittlerweile sind eine Reihe verschiedener Techniken etabliert, mit denen Calciumphosphat, insbesondere Hydroxylapatit (HAp), auf metallische Implantate

aufgebracht werden können. Dazu gehört das Plasmasprühen, die Laserstrahlverdampfung, biomimetische Kristallisationsprozesse durch z. B. Tauchverfahren, elektrophoretische Abscheidung, Sol-Gel-Prozesse und das Radiofrequenz-(RF-)Magnetronspattern.

Beim *Plasmaspritzen* wird festes Calciumphosphat-Pulver in ein Plasma von mehreren tausend Grad eingespritzt. Dabei schmilzt das Calciumphosphat und trifft auf ein rotierendes Implantat, wobei es schnell abkühlt und fest auf der Metalloberfläche anhaftet. Dabei entstehen oft innerhalb der Beschichtung unterschiedliche Phasen von Calciumphosphat.⁽¹²³⁾

Beim *Laserstrahlverdampfen* wird Calciumphosphat im Vakuum mit einem gepulsten Laser hoher Photonenenergie verdampft. Die dabei aus dem Target herausgelösten Cluster kondensieren auf dem Implantat zu einer Calciumphosphat-Schicht.⁽¹²⁴⁾

Biomimetische Kristallisationsprozesse können stattfinden, indem ein Implantat nach vorhergehender Oberflächenbehandlung in eine übersättigte Calciumphosphat-Lösung oder „*Simulated Body Fluid*“ getaucht wird. Dabei wird Calciumphosphat auf der Oberfläche abgeschieden. Hierbei können auch Biomoleküle mit aufgebracht werden.⁽¹²⁵⁾

Bei der *elektrophoretischen Abscheidung* nutzt man die abnehmende Löslichkeit von Calciumphosphat bei steigendem pH-Wert. Das Implantat wird als Kathode geschaltet. Durch die Abgabe von Elektronen um das Implantat herum erhöht sich lokal der pH-Wert, so dass Calciumphosphat auf dem Implantat abgeschieden wird.^{(126),(127)}

Mit *Sol-Gel-Prozessen* können aus calcium- oder phosphathaltigen Präkursorlösungen nach dem bottom-up-Prinzip Sole erzeugt werden. Durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen führt die steigende Reaktionsdauer zur Bildung von Gelfilmen. Dies kann z. B. im Tauchprozess oder durch Spin-Coating geschehen. Durch Trocknung der Filme und anschließende Temperaturbehandlung bei mehreren hundert Grad werden unerwünschte Restbestandteile und Lösungsmittel entfernt. Dabei wird die Schicht verdichtet und gehärtet. Die Prozesskontrolle ist hierbei entscheidend für die entstehende Phase, Dicke und Homogenität der Schicht.^{(128),(129)}

Bei den meisten der genannten Methoden bestehen Probleme hinsichtlich der Kontrolle über die entstehende Calciumphosphat-Phase und der schwachen Adhäsion an das Implantat.⁽¹³⁰⁾ Durch die Dicke bis in den mm-Bereich kann es *in vivo* zur Osteolyse kommen. Zudem ist eine weitere Biofunktionalisierung nur über die Physisorption von Biomolekülen möglich. Dies führt aber zu den in Abschnitt 1.1 bereits genannten Problemen. Mittels *RF-Magnetronspattern*^{(131)–(134)} lässt sich eine deutlich bessere Kontrolle über die Prozessbedingungen erzielen, da hier dichte, dünne und uniforme Schichten produziert werden können.^{(124),(135),(136)(133)(133),(137)} Beim RF-Magnetronspattern wird ein Target aus Calciumphosphat als Kathode geschaltet, das zu beschichtende Substrat als Anode. Der Prozess findet unter Inertgas (üblicherweise Argon) statt. Durch ein hochfrequentes elektrisches Wechselfeld (engl. *radio frequency*) kollidieren Elektronen mit Argonatomen, es entstehen Argonionen. Durch ein zusätzliches Magnetfeld unter dem Target werden die Elektronen auf eine Spiralbahn gezwungen, wodurch die Kollisionsrate mit Argonatomen direkt über dem Target erhöht wird. Dadurch wird ein Plasma erzeugt. Die Ionen werden in Richtung des Targets beschleunigt und lösen dort durch Kollisionen mit dem Target Atome aus dem Material. Dieses herausgelöste Material wird dann auf dem Substrat abgeschieden (Abb. 2-3). Hierbei können sehr dünne (wenige nm-dicke) Schichten hergestellt werden.

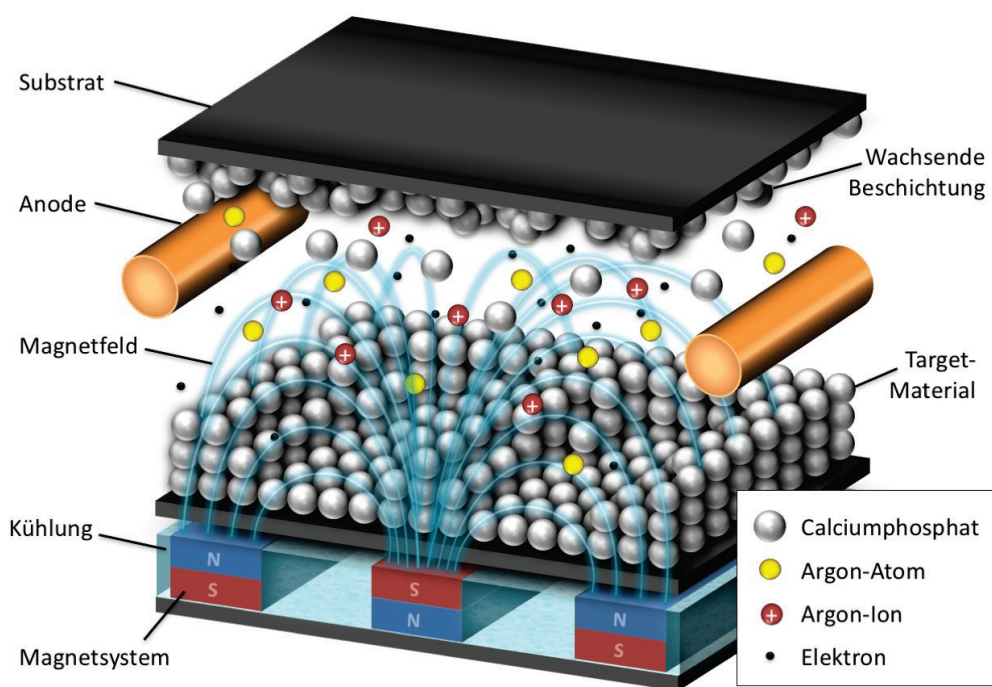


Abb. 2-3: Prinzip des Hochfrequenz-Magnetronspatterns: Durch ein hochfrequentes Wechselfeld kollidieren Argonatome mit Elektronen, wodurch ein Argonplasma aus Argonionen entsteht. Dieses Plasma wird über ein Magnetfeld verstärkt. Die Argonionen werden über auf das Target beschleunigt und lösen dort Atome heraus, die sich auf dem Substrat abscheiden.

Die Dicke der Calciumphosphat-Beschichtung ist wichtig für die Konzentration an lokal freigesetzten Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen und die Bioresorbierbarkeit *in vivo*. Die Phase des Calciumphosphat hat ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Resorbierbarkeit.^{(132),(138),(139)(140)} Da mit zunehmender Schichtdicke auch die Wahrscheinlichkeit einer Ablösung der Calciumphosphat-Schicht steigt, sind die mit RF-Magnetronsputtering aufgetragenen Schichten im nm- bis μm -Bereich stabiler als die mit anderen Verfahren aufgetragenen Calciumphosphat-Beschichtungen.^{(141)(142),(143)} Zudem lassen sich dünne Schichten erheblich besser mit vielen verschiedenen Methoden analysieren.^{(137),(144)} RF-Magnetrongesputterte Calciumphosphat-Schichten bieten daher eine gute Ausgangsbasis für den Aufbau einer molekularen Biofunktionalisierung, z. B. mit osteoinduktiven Wachstumsfaktoren.

2.2 Experimentelle Methoden

2.2.1 Oberflächenplasmonen-Spektroskopie

An einer Metall-Dielektrikum-Grenzfläche kann über einen einkoppelnden Impuls die Oszillation von longitudinalen Elektronendichteschwankungen angeregt werden. Die Ausbreitung einer Elektronendichteschwankung entlang der Metall-Dielektrikum-Grenzfläche bezeichnet man als Oberflächenplasmon. Das Oberflächenplasmon verhält sich als evaneszente Welle und breitet sich in x-Richtung aus. Die elektrische Feldstärke fällt in Ausbreitungsrichtung und in z-Richtung exponentiell ab.

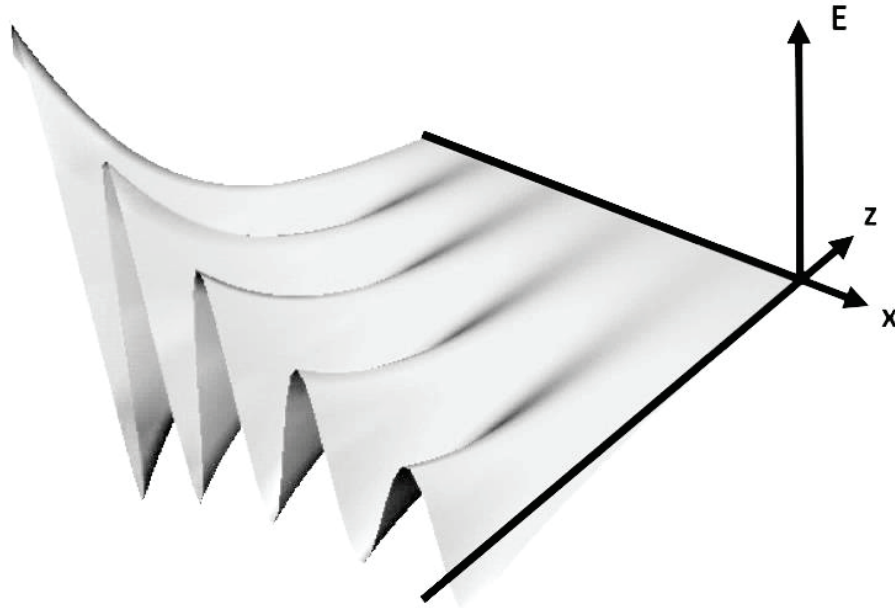


Abb. 2-4: Ausbreitung eines Oberflächenplasmons auf einer Metalloberfläche. Das elektrische Feld fällt in Ausbreitungsrichtung und senkrecht zur Oberfläche exponentiell ab.

Ein Oberflächenplasmon kann unter Beachtung der Energie- und Impulserhaltung mit Photonen oder Elektronen angeregt werden. Das Photon koppelt an die Änderung des elektrostatischen Feldes der Plasmaschwingung. Dabei wird Photonenenergie übertragen, die einem ganzzahligen Vielfachen der Plasmonenenergie entspricht. Die Stetigkeitsbedingungen für die tangentialen Komponenten des elektromagnetischen Feldes können nur für parallel polarisierte (*p*-polarisierte) Wellen erfüllt werden. Der elektrische Feldvektor der *p*-polarisierten Strahlung erzeugt auf der Oberfläche eine Ladungsseparation. Die ebenfalls parallel zur Oberfläche orientierte k_x -Komponente des eingestrahlichten Lichtes bewirkt nun eine Propagation der erzeugten Oberflächenplasmonen in *x*-Richtung. Aus den Maxwell-Gleichungen kann die Beziehung zwischen dem Impuls des Oberflächenplasmons und der eingestrahlichten Photonenenergie hergeleitet werden. Diese *Dispersionsrelation* des Oberflächenplasmons lautet für eine Metall-Dielektrikum-Grenzfläche:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad \text{und} \quad k_{yi} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_i^2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

mit: k_x = Wellenvektor des Oberflächenplasmons in Ausbreitungsrichtung
 k_{yi} = Wellenvektor des Oberflächenplasmons in *y*-Richtung, $i = 1, 2$
 ω = Kreisfrequenz
 c = Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
 ϵ_1/ϵ_2 = Dielektrische Konstanten des Dielektrikums und des Metalls

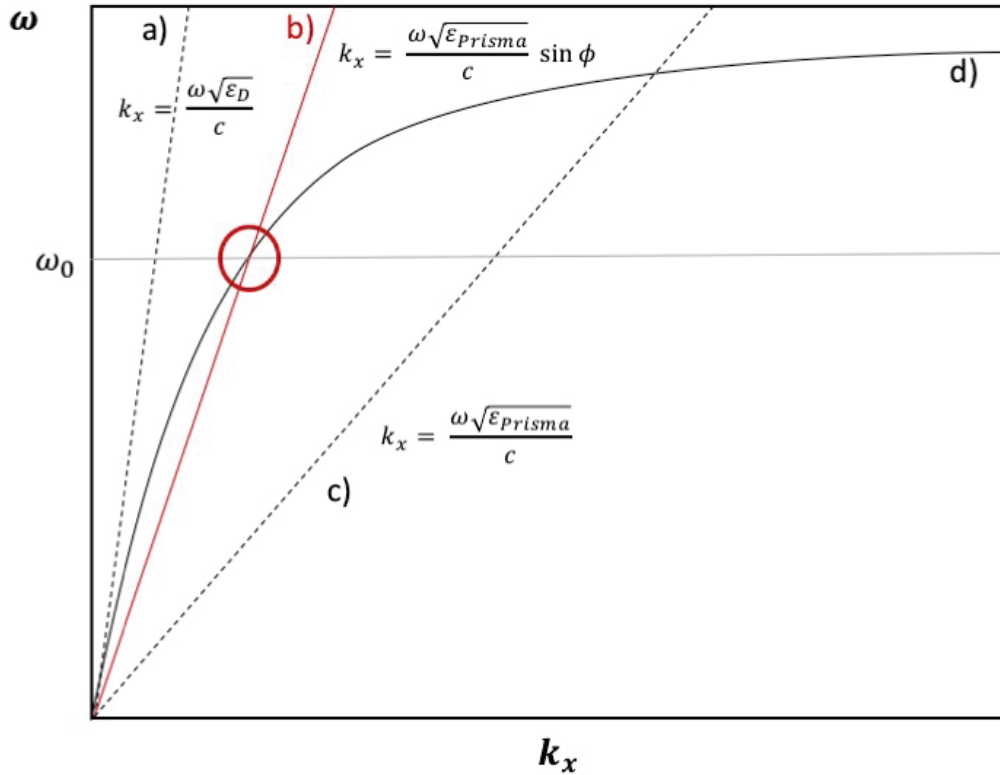


Abb. 2-5: Dispersionsrelation für Licht in einem Dielektrikum (a) und bei Verwendung eines Prismas (c). Ein Schnittpunkt der Lichtgeraden mit der Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons (d) existiert bei Einsatz eines Dielektrikums mit $\sqrt{\epsilon} > 1$ (c). Durch Variation des Einfallswinkels bei definierter Photonenenergie ω_0 kann der Schnittpunkt der Lichtgeraden mit der Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen eingestellt werden (b).

Die dielektrische Konstante des Metalls ϵ_2 ist aufgrund der freien Elektronen für $\omega < \omega_p$ negativ. Dort kann sich ein elektromagnetisches Feld folglich nicht ausbreiten. Es gilt:

$$\epsilon_2(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad \text{mit:} \quad \omega_p = \sqrt{\frac{4\pi n_e e^2}{m_e}} \quad (\text{Gl. 2-2})$$

mit: ω_p = Plasmafrequenz, bei der Oszillation der Ladungsdichte auftritt
 n_e = freie Elektronendichte
 e = Elementarladung
 m_e = Masse des Elektrons

Für den Fall $\epsilon_2 > -\epsilon_1$ ist k_{yi} imaginär, das Oberflächenplasmon propagiert nur in x-Richtung. Die Eindringtiefe in das Metall beträgt nur wenige nm, in das angrenzende Dielektrikum in etwa die Hälfte der eingesetzten Wellenlänge.

Um ein Oberflächenplasmon anzuregen, muss bei konstanter Frequenz der Impuls des Wellenvektors k_x erhöht werden. Wie in den Dispersionrelationen in Abb. 2-5

dargestellt, gibt es bei Anregung mit Licht für $k_x > 0$ im Vakuum keinen Schnittpunkt mit der Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen. Um eine Kopplung des eingestrahnten Lichtes (bei konstanter Frequenz ω) zu erreichen, muss das Licht durch ein dispergierendes Medium (z. B. ein Glasprisma) mit einem Brechungsindex $n > 1$ eingestrahlt werden. In dieser Arbeit wurde dazu Prismenkopplung in der Kretschmann-Konfiguration verwendet. Hierbei kann nach Gleichung 2-3 durch Variation des Einfallswinkels θ der Lichtwellenvektor k_x verändert werden, bis er mit dem Realteil des komplexen Wellenvektors des Oberflächenplasmons übereinstimmt:

$$k_{Pl} = k_x$$

$$\frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} = n \frac{\omega}{c} \sin \theta \quad (Gl. 2-3)$$

Bei der Kretschmann-Anordnung wird ein hochbrechendes Glasprisma mit einem goldbeschichteten Glasträger über Indexöl gematcht. Das eingestrahlte Licht wird von der Goldoberfläche reflektiert und detektiert. Die Photonenenergie wird zur Anregung des Oberflächenplasmons genutzt. Die dabei gemessene reflektierte Intensität des eingestrahnten Lichtes als Funktion des Einfallswinkels ist im Resonanzwinkel minimal (Abb. 2-6). Oberflächenplasmonen können nur oberhalb vom Winkel der Totalreflexion θ_c angeregt werden. Für $\theta > \theta_c$ dringt ein evaneszenter Anteil des elektromagnetischen Feldes durch die Metallschicht und regt auf der dem Prisma abgewandten Seite Oberflächenplasmonen an.

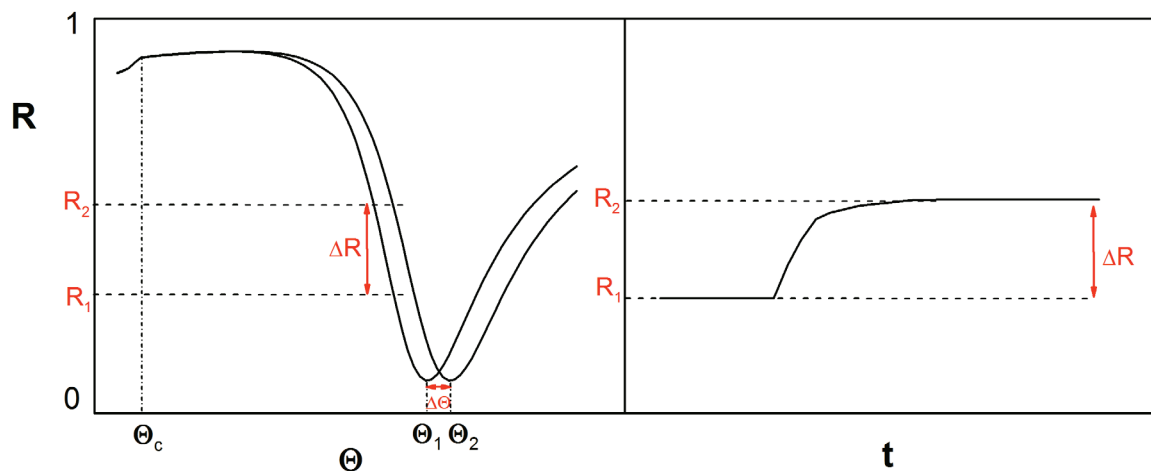


Abb. 2-6: Oberflächenplasmonenscan (SPR-Scan) (links) und die als Echtzeitkinetik messbare Änderung der Reflektivität bei Verschiebung des Oberflächenplasmons (rechts). $\theta_{1,2}$ sind die Winkel, bei denen Oberflächenplasmonenresonanz auftritt, θ_c ist der Totalreflexionswinkel.

Die Sensitivität der Oberflächenplasmonenspektroskopie liegt darin begründet, dass das elektromagnetische Feld der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche konzentriert ist. Geringste Änderungen im angrenzenden Dielektrikum führen zu einer Verschiebung der Dispersionskurve und damit auch von θ_{Res} zu höheren Winkeln. Dies kann durch Messung der Reflektivität bei einem konstanten Winkel kinetisch verfolgt werden (Abb. 2-6). Mittels der Fresnel'schen Formeln kann die Reflektionsamplitude r_p an der Grenzfläche als Funktion des Einfallswinkels quantitativ beschrieben werden.

$$r_p = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad (Gl. 2-4)$$

Durch rekursive Berechnung der entsprechenden Reflexionsamplituden jeder Schicht wird die Gesamtreflektivität des Schichtsystems theoretisch ermittelt. Durch Vergleich mit der gemessenen Kurve und Variation der Schichtparameter (ϵ , Schichtdicke d) kann die berechnete Kurve angepasst werden. So kann bei Kenntnis des Brechungsindex n die Schichtdicke einer adsorbierten Schicht aufgrund der in erster Näherung proportionalen Beziehung von $\Delta\theta$ zu $\Delta n d$ mit einer Genauigkeit von bis zu $\pm 0,1$ nm ermittelt werden.

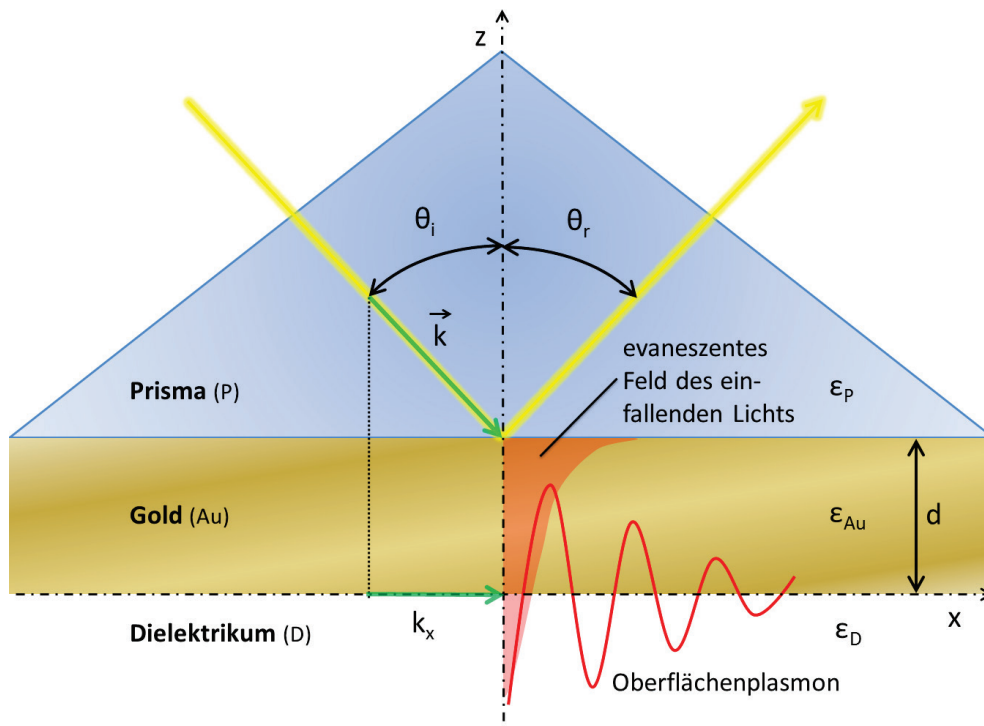


Abb. 2-7: Erzeugung eines Oberflächenplasmons an einer Gold-Dielektrikum-Grenzfläche durch Einsatz eines ATR-Prismas in Kretschmann-Konfiguration.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Glasobjektträger aus hochbrechendem Glas (LaSFN9) mit einer 50 nm dicken Goldspatterschicht verwendet. Der Glasobjektträger wurde in Kretschmann-Konfiguration auf eine Durchflussmesszelle gesetzt. Über ein Doppelgoniometer konnte die Messzelle von 0 – 90° relativ zum einfallenden Laserstrahl gefahren werden (Abb. 2-8).

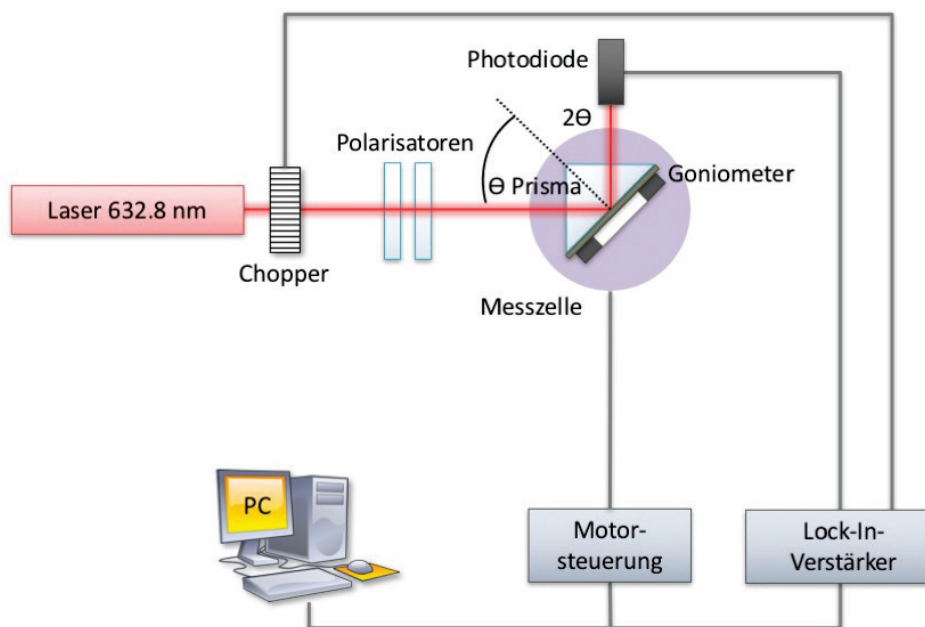


Abb. 2-8: Aufbau eines Oberflächenplasmonenresonanz-Spektrometers.

2.2.2 Oberflächenplasmonen-Fluoreszenz-Spektroskopie

Erzeugt man an einer Metall-Dielektrikum-Grenzfläche ein Oberflächenplasmon, wird nahezu die gesamte Strahlungsenergie des Lasers auf das Plasmon übertragen. Dadurch kommt es zu einer signifikanten Verstärkung des evaneszenten Feldes. Dieses Phänomen kann genutzt werden, um Chromophore zur Fluoreszenz anzuregen. Die Fluoreszenz wird detektiert, indem in der Kretschmann-Konfiguration zusätzlich eine Sammellinse, ein optischer Filter und ein Photomultiplier eingebaut werden (Abb. 2-9).^{(145),(146)}

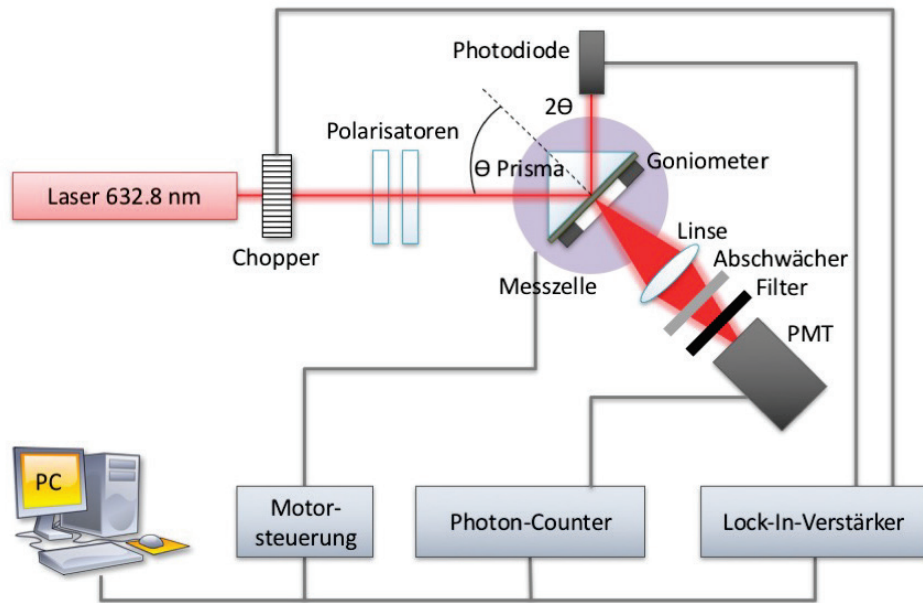


Abb. 2-9: Aufbau eines SPF-Spektrometers in der Kretschmann-Konfiguration. Neben der Detektion der Reflektivitätsänderung durch die Photodiode ist auf der Unterseite der Messzelle über einen Photomultiplier (PMT) die Detektion von Fluoreszenz möglich. Ein vorgeschalteter Filter subtrahiert die Eigenfluoreszenz des Lasers.

Durch die eingestrahlte Photonenenergie gelangen die Elektronen des Chromophors in ein energetisch höheres Niveau S_1^* . Dieser Zustand ist sehr instabil und die Elektronen fallen strahlungslos unter einer Konformationsänderung des Chromophors auf den energetisch leicht niedrigeren Zustand S_1 zurück. Von dort aus relaxiert das Elektron in den Grundzustand S_0 und emittiert dabei ein Photon. Die Energie dieses Photons ist geringer als die gesamte absorbierte Energie, weshalb das emittierte Photon rotverschoben ist (Stokes-shift). Die emittierte Fluoreszenz wird mit dem Photomultiplier detektiert. Hierbei ist allerdings entscheidend, in welchem Abstand zur Goldoberfläche sich das Chromophor befindet. Ist das Chromophor direkt an der Oberfläche positioniert und damit das Metall im Bereich des Försterradius, so resultiert eine Energieübertragung von dem angeregten Donor (Chromophor) auf das Metall als Akzeptor. Daher kann so keine Fluoreszenz beobachtet werden. Ist das Chromophor weiter von der Metalloberfläche entfernt (ca. 10 nm), kann noch ein Teil der Anregungsenergie zurück in die Metallschicht koppeln. Dies führt zur Anregung einer rotverschobenen Oberflächenplasmonenmode, die im Resonanzwinkel über das Prisma auskoppeln kann. Befindet sich das Chromophor in größerer Entfernung zur Metallschicht (ca. 20 nm), so kann die Fluoreszenz frei ins Dielektrikum emittieren und durch den Photomultiplier detektiert werden.⁽¹⁴⁷⁾ Die SPF-Spektroskopie hat eine höhere Sensitivität als die

SPR-Spektroskopie. Die Genauigkeit der Detektion ist bis in den attomolaren Bereich möglich (10^{-18} M).⁽¹⁴⁸⁾

Trägt man die Fluoreszenzintensität gegen den Einfallswinkel auf, wird diese am Resonanzwinkel maximal. Der Winkel des Fluoreszenzmaximums θ_{Fmax} ist kleiner als θ_{Res} . Am Punkt der Oberflächenplasmonenresonanz kommt es zu einem Phasensprung des reflektierten Strahls. Aufgrund der veränderten Phase interferiert der reflektierte Strahl destruktiv mit dem Oberflächenplasmon. Die vollständige Resonanz des Oberflächenplasmons ist gedämpft und wird erst bei einem geringfügig höheren Winkel erreicht. Tatsächlich ist daher θ_{Fmax} der Winkel, an dem die maximale Feldintensität durch die Anregung des Oberflächenplasmons erreicht wird.

2.2.3 Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie

Elektromagnetische Strahlung kann in Wechselwirkung mit Materie treten, indem die Strahlungsenergie $E = h\nu$ von der Materie absorbiert wird. Bei der Infrarotspektroskopie werden Rotations- und Schwingungsbewegungen von Atomen um die Gleichgewichtslage untersucht, die mit elektromagnetischer Strahlung im IR-Bereich angeregt werden können (800 nm – 1 mm). Besitzt die einfallende IR-Strahlung die gleiche Frequenz wie das elektromagnetische Feld des Moleküls, erfolgt Resonanz und Absorption der IR-Strahlung. Dabei sind aufgrund der Quantelung der Schwingungsenergie nur ganz bestimmte Schwingungs- und Rotationsübergänge erlaubt. Die Normalschwingungen der Moleküle können als über Federn verbundene Massen nach der Newton'schen Mechanik modelliert werden. Eine genaue Beschreibung erhält man mithilfe der Schrödinger-Gleichung im eindimensionalen harmonischen Oszillatormodell:

$$V(r) = \frac{1}{2}kr^2 \quad (Gl. 2-5)$$

mit: V = potentielle Energie
 k = Kraftkonstante
 r = Bindungslänge

Nach Taylorreihenentwicklung von $V(r)$ um die Gleichgewichtslage $r = 0$ erhält man

$$V(r) \approx \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dr^2} \right)_0 r^2 \quad (Gl. 2-6)$$

Nach Einsatz in die zeitunabhängige Schrödingergleichung

$$E\Psi = -\frac{\hbar^2}{2m_{eff}} \frac{d^2\Psi}{dr^2} + \frac{1}{2}kr^2\Psi \quad (Gl. 2-7)$$

mit: m_{eff} = effektive Masse
 \hbar = reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum
 Ψ = Wellenfunktion
 E = Energie

sind nur diskrete Energiezustände erlaubt:

$$E_n = \hbar\omega \left(n \pm \frac{1}{2}\right) \text{ mit } n = 0, 1, 2 \dots \text{ und } \omega = \sqrt{\frac{k}{m_{eff}}} \quad (Gl. 2-8)$$

Der IR-Bereich des elektromagnetischen Spektrums wird in das nahe Infrarot (NIR, 800 nm – 3 μ m), das mittlere Infrarot (MIR, 3 – 30 μ m) und das ferne Infrarot (FIR, 30 μ m – 1 mm) unterteilt. Während im MIR Grundschrwingungen spezifischer Molekülgruppen angeregt werden können, findet man im NIR die entsprechenden Oberschrwingungen. Im FIR ist die Korrelation von Banden zu Schrwingungen einzelner Molekülgruppen nicht mehr möglich, hier absorbieren unspezifische Gerüstschwrwingungen. Die IR-Absorption findet nur statt, wenn mit der Schrwingung eine Änderung des induzierten Dipolmoments μ_{el} einhergeht:

$$\left(\frac{\partial\mu_{el}}{\partial x}\right)_{x=x_0} \neq 0 \quad (Gl. 2-9)$$

mit: μ_{el} = elektrisches Dipolmoment
 $x - x_0$ = Auslenkung

IR-inaktive Schrwingungsübergänge sind Raman-aktiv und können mittels Raman-Spektroskopie detektiert werden.

Die absorbierte Wellenlänge des Lichtes fehlt im Spektrum des Lichtes nach Interaktion mit der Probe. Anstelle der Wellenlänge wird aufgrund der Proportionalität zur eingestrahnten Photonenenergie meist die Wellenzahl in cm^{-1} angegeben. Die Position und Form der Banden in einem IR-Spektrum werden durch verschiedene Parameter beeinflusst. So kann der Wellenzahlbereich, in dem eine charakteristische Schrwingung auftritt, durch Schrwingungskopplung mit benachbarten Molekülen verschoben sein. Die Kraftkonstante der Bindung beeinflusst die Bandenposition ebenfalls. So liegen die Bandenpositionen einer C-C und einer C \equiv C Bindung ca. 1000 cm^{-1} auseinander. Darüber hinaus können

induktive Effekte in einer Bindung zu einer Schwingungsfrequenzerhöhung bzw. -erniedrigung führen. Auch die Substitution von Atomen durch Isotope anderer Masse wirkt sich auf die Schwingungsfrequenz aus. So verschiebt sich die Valenzschwingung der Hydroxylgruppe ν_s (O-H) von Wasser bei Substitution mit Deuterium um ca. 900 cm^{-1} . Sterische Effekte wie die Ringspannung in zyklischen Molekülen und auch der Aggregatzustand eines Moleküls führen ebenfalls zu einer Veränderung der Schwingungsfrequenz. Auch Wasserstoffbrückenbindungen verbreitern die Valenzschwingung der Hydroxylgruppe ν_s (O-H) erheblich. Trotz dieser Vielzahl an Parametern, welche die Bandenposition beeinflussen können, ist die FTIR-Spektroskopie heutzutage ein wichtiges Werkzeug zum Nachweis chemischer Verbindungen. Durch verbesserte Techniken ist die FTIR-Spektroskopie mittlerweile auch eine etablierte Methode in der Proteinanalytik. Hierbei können die Sekundärstruktur und die Stabilität von Proteinen unter verschiedenen externen Faktoren wie Druck, Temperatur und pH-Wert untersucht werden.

Aufbau eines Michelson FTIR-Spektrometers

Es wird zwischen nicht-dispersiven, dispersiven und Fourier-Transform(FT)-Spektrometertypen unterschieden. Bei nicht-dispersiven Geräten ist eine Wellenlängenselektion nicht möglich. Bei dispersiven Geräten kann polychromatisches Licht in monochromatisches zerlegt werden. Bei den FT-Spektrometern wird ein Michelson-Interferometer verwendet, bei dem die polychromatische Zweistrahlinformation mathematisch über Fouriertransformation in spektrale Information übertragen wird.

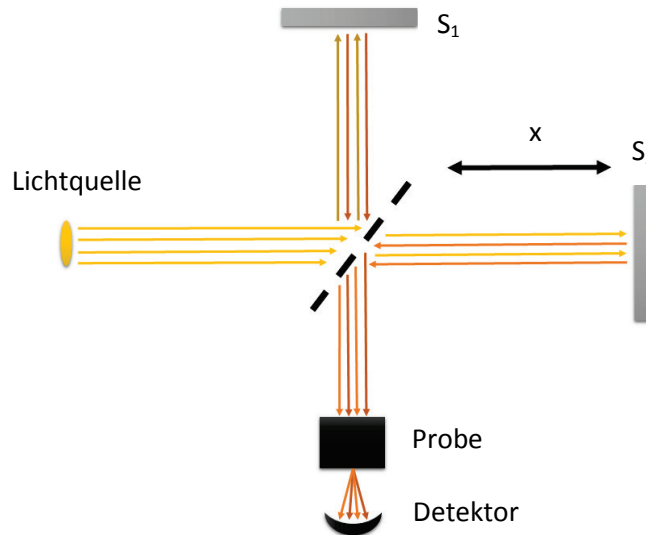


Abb. 2-10: Aufbau eines Michelson-Interferometers. Eine polychromatische Lichtquelle erzeugt einen Strahl, welcher an einem Strahlteiler in Strahlenbündel gleicher Intensität aufgespalten wird. Ein Teil dringt durch den halbdurchlässigen Strahlteiler und wird an einem um die Weglänge x beweglichen Spiegel S_2 reflektiert. Der andere Teil wird orthogonal reflektiert und an einem festen Spiegel S_1 zurückgeworfen. Beide Strahlenbündel werden wiedervereinigt, allerdings mit einer Phasenverschiebung, abhängig vom Spiegelweg x . Dadurch kommt es zu Interferenzen. Nach Kontakt mit der Probe wird das Signal detektiert und anschließend über Fourier-Transformation in ein Spektrum umgewandelt.

Das Michelson-Interferometer besitzt einen Strahlteiler, der 50 % der Intensität des Strahles durchlässt und den gleichen Anteil orthogonal zum Eingangsstrahl reflektiert. Von einem unbeweglichen Spiegel wird ein Teil des Strahls wieder zurückgeworfen. Ein zweiter Spiegel ist um die Weglänge x beweglich und reflektiert das Licht dementsprechend phasenversetzt. Der transmittierte und reflektierte Strahl vereinigen sich zu einem Strahlenbündel, wobei in Abhängigkeit der Spiegelbewegung konstruktive bzw. destruktive Interferenzen in dem Strahlenbündel auftreten. Das resultierende Interferogramm zeigt die Abhängigkeit der Intensität I_{Int} vom Spiegelweg x mit

$$I_{\text{Int}}(x) = K(\nu) \int_{-\infty}^{+\infty} I_{\text{Strahl}}(\nu) \cos(2\pi\nu x) d\nu \quad (\text{Gl. 2-10})$$

mit: I_{Strahl} = Strahlintensität
 $K(\nu)$ = gerätespezifische Konstante
 ν = Wellenzahl / cm^{-1}

Durch Fouriertransformation kann dieses Interferogramm nun in ein frequenzabhängiges Intensitätssignal umgerechnet werden:

$$I_{Strahl}(\nu) = K(\nu) \int_{-\infty}^{+\infty} I_{Int}(x) \cos(2\pi\nu x) dx \quad (Gl. 2-11)$$

Durch Verrechnung des Hintergrundinterferogramms mit dem Interferogramm der Probe erhält man ein Extinktionsspektrum. Dieses wird in ein Spektrum umgerechnet, bei dem die Transmission gegen die Wellenzahl ν [cm⁻¹] aufgetragen wird.

Ein Michelson-Interferometer besitzt gegenüber dispersiven Geräten erhebliche Vorteile, da polychromatisches Licht eingesetzt werden kann, was in einer verkürzten Messzeit gegenüber dispersiven Methoden resultiert. Die spektrale Auflösung ist nur durch den Gangunterschied des Spiegelwegs begrenzt, wodurch eine hohe Wellenzahlgenauigkeit erreicht wird. Zusätzlich ist das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert.

Spezialfall IRRAS

Die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) erlaubt die Analyse von Schichten in der Größenordnung der eingesetzten Wellenlängen. So können unter idealen Voraussetzungen monomolekulare Schichten analysiert werden. Bei der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie werden plane, reflektierende (meist metallische) und IR-undurchlässige Oberflächen eingesetzt. Ein Teil der Strahlung dringt durch die Schicht hindurch, wird an der Grenzfläche reflektiert und tritt dabei in Wechselwirkung mit der adsorbierten Schicht. Ein kleiner Teil reflektiert aber auch direkt an der Grenzfläche der Schicht und liefert so einen Beitrag zum Spektrum. Generell ist die Intensität des Messsignals sehr gering; es gibt aber Bedingungen, bei denen die Intensität des erhaltenen Messsignals erheblich verstärkt werden kann.

Hierbei ist entscheidend, dass die Absorption von infrarotem Licht stark von dem dielektrischen Verhalten des Metalls abhängt. Das elektrische Feld des eingestrahnten Lichtes sowie das elektrische Dipolmoment der adsorbierten Moleküle wechselwirken mit dem Elektronengas des Metalls. Der elektromagnetische Feldvektor des Lichtes ist parallel (*s*) und senkrecht (*p*) zur Probenoberfläche orientiert. Die Wechselwirkung mit dem Elektronengas des Metalls hebt die parallele Komponente auf. Die senkrechte Komponente addiert sich dagegen zu der Normalkomponente des Feldvektors der Oberfläche, der dadurch signifikant verstärkt wird. Es kommt zu einer Verschärfung der Auswahlregeln für IR-aktive

Moleküle. Es werden verstärkt solche Schwingungen angeregt, deren Richtungsvektor des elektrischen Dipolmomentes orthogonal zur Probenoberfläche orientiert ist. Durch Einsatz von *p*-polarisiertem Licht kann speziell die Signalintensität solcher Schwingungen um ein Vielfaches verstärkt werden. Für *s*-polarisierte Strahlung resultiert an der metallischen Grenzfläche unabhängig vom Einfallswinkel nur eine geringe elektrische Feldstärke, die eine Detektion praktisch unmöglich macht. Durch einen streifenden Einfall des Lichtes erreicht man, dass ein möglichst großer Anteil davon senkrecht zur Oberfläche steht. In der Praxis wird dazu häufig ein Einfallswinkel von 80° verwendet.

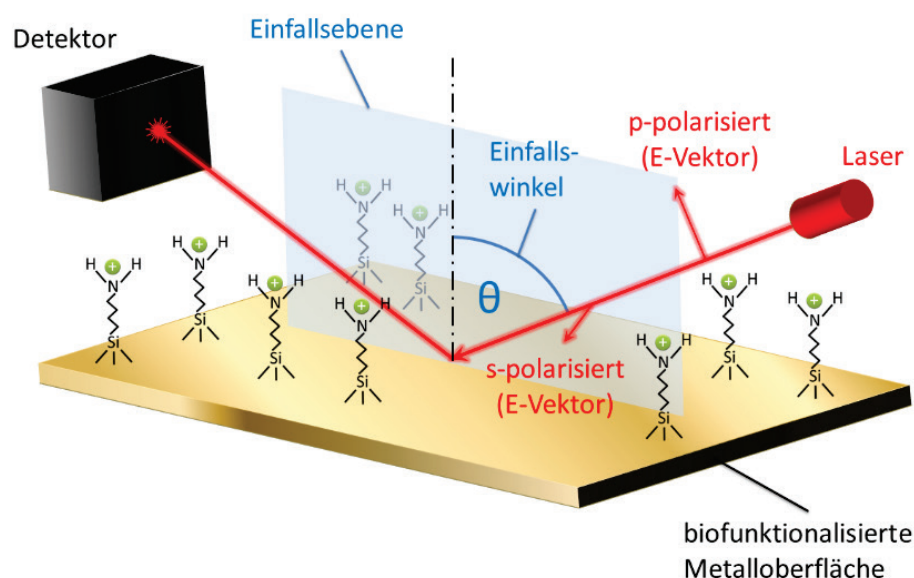


Abb. 2-11: Prinzip der IR-Reflexions-Absorptionsspektroskopie. Durch den Einsatz von *p*-polarisiertem Licht werden verstärkt orthogonal zur Oberfläche orientierte Moleküle zu Schwingungen angeregt.

Die IRRAS wird meist genutzt, um die Orientierung von Monolayern auf einer Oberfläche zu bestimmen. Das Dipolmoment einer auf einer Oberfläche adsorbierten Alkylkette teilt sich in ein parallel und senkrecht zur Oberfläche orientiertes Dipolmoment auf. Da bei IRRAS-Messungen die parallele Komponente des Dipolmomentes nicht zur Messung beiträgt, erhält man allein die senkrecht orientierte Komponente. Bei Kenntnis der Orientierung des Dipolmoments im Molekül kann der zwischen Oberfläche und Molekülachse eingeschlossene Winkel berechnet werden.

Darüber hinaus bestehen viele Anwendungen der IRRAS in der Untersuchung von Eigenschaften (biologischer) Moleküle an Grenzflächen. Dazu gehören neben der Untersuchung des Neigungswinkels die Ermittlung von Kettenlängen, deren

Konformation, Phasenübergängen und sogar Sekundärstrukturanalysen von auf Oberflächen adsorbierten Proteinen⁽¹⁴⁹⁾.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IRRAS verwendet, um den Aufbau eines Multilagenschichtsystems qualitativ zu dokumentieren und die Menge an adsorbiertem Protein zu quantifizieren.

2.2.4 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist ein zerstörungsfreies Messverfahren, das dazu dient, optische Eigenschaften ultradünner Schichten zu bestimmen. Dabei können die Schichtdicke und der Brechungsindex dünner Schichten als Lösung der Fresnel'schen Formeln ermittelt werden. Grundlage dafür ist eine Änderung des Polarisationszustandes von linear polarisiertem Licht bei Reflexion an einer Oberfläche. Linear polarisiertes Licht ist dann vorhanden, wenn die orthogonal zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes schwingenden elektromagnetischen Felder in gleicher Phase schwingen. Trifft linear polarisiertes Licht unter einem definierten Winkel α ($0^\circ < \alpha < 90^\circ$) auf eine dünne Schicht, so wird es teilreflektiert und teilweise gebrochen. Dabei ändert sich der Polarisationszustand des reflektierten Lichtes, der über das Amplitudenverhältnis Ψ des reflektierten Lichtes und dessen Phasendifferenz Δ angegeben wird. Die Änderung des Polarisationszustandes kann mathematisch durch die ellipsometrische Grundgleichung beschrieben werden:

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan(\psi) e^{i\Delta} \quad (\text{Gl. 2-12})$$

mit den Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten r_p und r_s :

$$r_p = \frac{N_2 \cos \theta_1 - N_1 \cos \theta_2}{N_2 \cos \theta_1 + N_1 \cos \theta_2} \quad (\text{Gl. 2-13})$$

$$r_s = \frac{N_2 \cos \theta_1 - N_1 \cos \theta_2}{N_2 \cos \theta_1 + N_1 \cos \theta_2} \quad (\text{Gl. 2-14})$$

Dabei sind $N_{1,2}$ und $\theta_{1,2}$ die Brechungsindices bzw. Einfallswinkel und Brechungswinkel des Lichtsstrahls bei Lichtbrechung an einer Oberfläche.

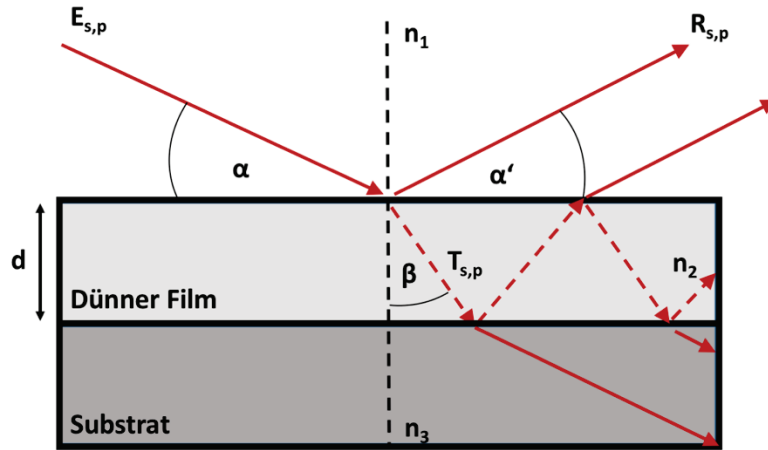


Abb. 2-12: Reflexion und Lichtbrechung an der Grenzfläche eines dünnen Films auf einem Substrat gegen Luft. Der einfallende Lichtstrahl $E_{s,p}$ trifft unter einem Einfallswinkel α auf eine beschichtete Oberfläche. Dort transmittiert ein Teil des Strahls $T_{s,p}$, durch den Film mit dem Brechungsindex n , ein Teil wird mit veränderter Polarisation reflektiert ($R_{s,p}$).

Die Phasenverschiebung der elektromagnetischen Welle verläuft für die parallel und senkrecht zur Einfallsebene schwingende Komponente unterschiedlich, da ihre Amplituden unterschiedlich stark gedämpft werden. In der Folge ist das reflektierte Licht dann elliptisch polarisiert. Bei einer ellipsometrischen Messung werden das Amplitudenverhältnis der p- und s-Komponenten des reflektierten Strahls (Ψ) und die Phasenverschiebung (Δ) bestimmt (Gleichung 2-12). Die Phasenänderung ϕ des gebrochenen Lichtes entsteht beim Durchlaufen der obersten Schicht. In diese Phasenänderung fließen die Schichtdicke d , der Brechungsindex n der Schicht und die Wellenlänge λ des eingesetzten Lasers (632,8 nm) ein.

$$\phi = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) n \cos \beta \quad (Gl. 2-15)$$

Durch Lösen der Gleichung 2-15 kann man bei sehr genauen Messergebnissen die Schichtdicke ($> 1 \text{ \AA}$) oder den Brechungsindex erhalten. Die Methode wurde in dieser Arbeit genutzt, um Schichtdicken im Multilagenschichtsystem zu bestimmen.

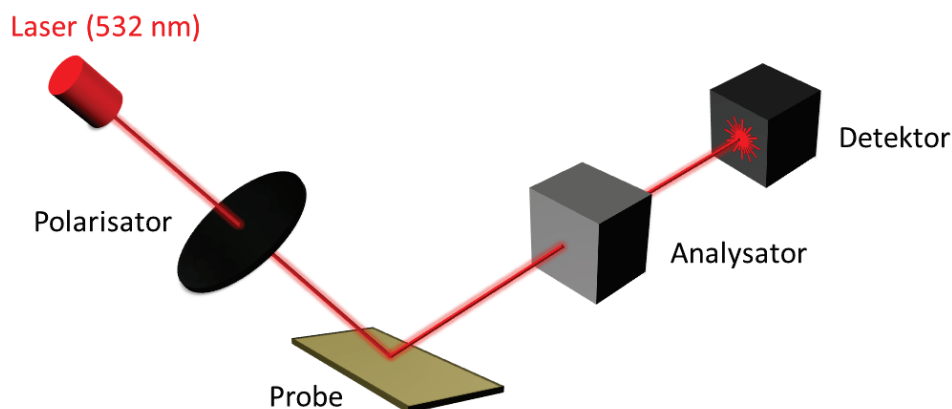


Abb. 2-13: Aufbau eines Ellipsometers.

Der Aufbau des verwendeten Nullellipsometers (Rudolph Research) ist in Abb. 2-13 dargestellt. Dabei wird monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 632,8 nm von einem Laser erzeugt und durch einen Polarisator linear polarisiert. Der linear polarisierte Laserstrahl wird an der Probenoberfläche reflektiert und dabei elliptisch polarisiert. Der anschließend folgende rotierende Analysator enthält einen zweiten Polarisator, der in Abhängigkeit von der Polarisatorposition nur einen bestimmten Anteil des elliptisch polarisierten Lichtes durchlässt. Dieses Licht wird im Detektor in ein elektrisches Signal umgewandelt und mit der vorher gemessenen Anfangspolarisation einer Referenz verglichen. Man erhält die ellipsometrischen Parameter Ψ und Δ , die mit der Software *DAFIBM* (Rudolph Research) zur Berechnung der Schichtdicke oder des Brechungsindex verwendet werden.

2.2.5 UV-VIS-Spektroskopie

Bei der UV/VIS-Anregung werden Valenzelektronen in den Molekülorbitalen aus dem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 versetzt. Dabei absorbiert das Molekül Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung $E = h\nu$ in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 200 - 760$ nm. Die dabei in den angeregten Zustand S_1 gelangten Valenzelektronen können durch die Emission eines Photons wieder in den Grundzustand S_0 gelangen. Die emittierten Photonen können z. B. mit Photomultipliern als Fluoreszenz detektiert werden.

Bei der UV/VIS-Spektroskopie wird die Absorption elektromagnetischer Strahlung von Biomolekülen in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 200 - 760$ nm bestimmt. In die Quantifizierung dieser Absorption fließen die Parameter der Wellenlänge λ , die Konzentration c des zu messenden Stoffes sowie die stoffspezifische Absorptions-

konstante ε ein. Die Intensität I des austretenden Lichtes wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c d} \quad (Gl. 2-16)$$

In dieser Arbeit wurde ein Specord 210 der Firma Analytik Jena verwendet.

2.2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden die Welleneigenschaften von Elektronen genutzt, um das Auflösungsvermögen der optischen Mikroskopie zu unterschreiten. Über die de Broglie-Beziehung kann die Wellenlänge λ eines Elektrons ermittelt werden:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (Gl. 2-17)$$

Dabei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum mit $h = 6.6261 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$, m = Masse des Elektrons und v die Geschwindigkeit des Elektrons. Für die Berechnung der Masse des Elektrons müssen aufgrund der hohen Geschwindigkeiten relativistische Effekte berücksichtigt werden.

Das optische Auflösungsvermögen d zwischen zwei Bildpunkten ist nach Abbé gegeben durch die Gleichung:

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha} \quad (Gl. 2-18)$$

Der Brechungsindex im Vakuum (n) beträgt 1. Der halbe Öffnungswinkel α ist gegenüber dem bei der Lichtmikroskopie sehr klein.

Während in der optischen Lichtmikroskopie das Auflösungsvermögen bei ca. 200 nm liegt, können bei der Elektronenmikroskopie in Abhängigkeit von der eingesetzten Beschleunigungsspannung theoretisch zwei Bildpunkte mit $< 1 \text{ nm}$ Abstand aufgelöst werden. In der Praxis liegt die Auflösung aufgrund von Beugungsfehlern deutlich niedriger.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Probenoberfläche mit einem gebündelten und durch magnetische Linsen fokussierten Elektronenstrahl im Hochvakuum abgerastert. Die Elektronen werden aus einer thermischen Glüh- oder kalten Feldemissionskathode emittiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Durch magnetische Feldspulen wird der Elektronenstrahl auf eine spiralförmige

Trajektorie gelenkt und durch elektrostatische Linsen im Durchmesser verkleinert. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probenoberfläche, so kann eine Vielzahl von Interaktionen stattfinden und detektiert werden. Es können Rückstreu- und Augerelektronen detektiert werden, hinzu kommen die aus der Oberfläche elastisch oder unelastisch gestreuten Sekundärelektronen. Darüber hinaus können auch energiedispersive Röntgen- und Bremsstrahlung gemessen werden. Kathodolumineszenz kann in Abhängigkeit der zu untersuchenden Oberfläche ebenfalls detektiert werden.

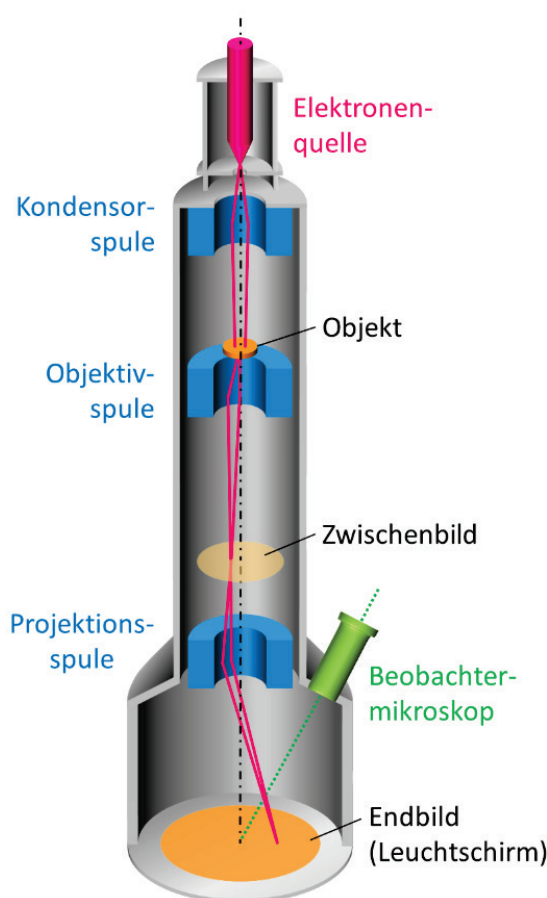


Abb. 2-14: Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.

Weitere Modifikationen der REM sind die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), *Environmental Scanning Electron Microscopy* (ESEM), Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM), und Rastertransmissionselektronenmikroskopie mit Polarisationsanalyse (SEMPA).

In dieser Arbeit wurde REM mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie eingesetzt (ESEM Quanta 400 FEG, Universität Duisburg-Essen, Essen).

2.2.7 Rasterkraftmikroskopie

Mit der Rasterkraftmikroskopie (AFM, *Atomic Force Microscopy*) kann die Oberfläche einer glatten Probe über eine feine Spitze abgerastert werden. Sie wurde 1986 von Binnig, Gerber und Quate entwickelt.⁽¹⁵⁰⁾ Es ist ein Mikroskop mit einer höheren Auflösung als das TEM und einem besseren Oberflächenkontrast als das REM. Es zeichnet sich durch eine einfache Probenvorbereitung aus und ist nicht auf elektrisch leitfähige Proben begrenzt, sondern auch für biologische Systeme und sogar in Flüssigkeiten anwendbar. Bei der Rasterkraftmikroskopie werden die Kräften zwischen Oberfläche und einer feinen Spitze genutzt, um ein topographisches Bild zu erstellen. Die über eine Feder befestigte Spitze rastert dabei mechanisch die Oberfläche ab. Die zwischen Oberfläche und Spitze auftretenden van-der-Waals-Kräfte bzw. Pauli-Repulsion führen in Abhängigkeit von der Entfernung zu einer Anziehung bzw. Abstoßung von der Oberfläche und damit zu einer Auslenkung der Feder. Diese Auslenkung verändert die Intensität des Lasers, der an der Rückseite der Feder reflektiert und mittels Photodiodendetektor als Spannungsdifferenz registriert wird. Im Feedback-Controller wird über die Spannungsdifferenz und vorgegebene Parameter (Gain, Resonanzfrequenz der Feder) berechnet, welche Spannung am Scanner angelegt werden muss, um die Feder wieder in die Ausgangslage zurückzubringen. Diese Spannung wird an einen piezoelektrischen Scanner angelegt, der sich daraufhin zusammenzieht oder ausdehnt und so die Probe sehr flexibel bewegen kann (Abb. 2-15). So wird ein topographisches Oberflächenprofil erzeugt, welches auf wenige Å genau ist. Die Genauigkeit der Auflösung hängt sehr stark von der Schärfe der Spitze und Störeinflüssen von außen ab. Deshalb muss das gesamte System schwingungs isoliert gegenüber äußeren Einflüssen sein.

Es sind grundsätzlich zwei verschiedene Messmodi möglich, mit denen eine Probe vermessen werden kann. Im Kontaktmodus wird die Biegung der Feder im Gleichstrom konstant gehalten und im direkten Kontakt zur Oberfläche gebracht. Dieser Modus ist für weiche Proben ungeeignet und führt schnell zu einer Abnutzung der Spitze. Im Intermittent-Modus (oder „Tapping-Modus“) wird durch Wechselstrom die Feder zur Oszillation angeregt und berührt nur kurzzeitig die Oberfläche. Hierdurch erhält die Spitze eine längere Lebensdauer, und auch biologische Proben können mit hoher Auflösung und zerstörungsfrei vermessen werden.

Durch Modifikation des Aufbaus eines AFMs kann eine Vielzahl an methodischen Varianten erzeugt werden (Scanning tunneling microscopy, STM; Scanning-near-field optical microscopy, SNOM; scanning thermal microscopy, SThM; scanning ion conductance microscopy, SICM).

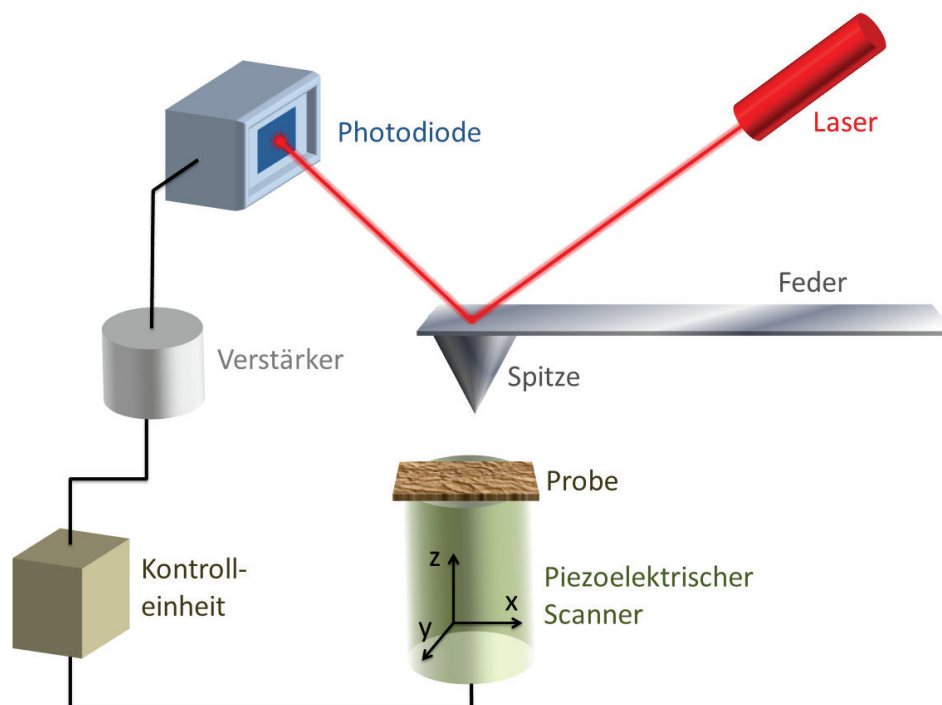


Abb. 2-15: Prinzip der Rasterkraftmikroskopie (AFM).

2.2.8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist heutzutage eine Standardmethode in analytischen Laboren, mit der Moleküle anhand ihres Masse-Ladungsverhältnisses (m/z) im ionisierten Zustand mit sehr hoher Genauigkeit (bis 10^{-12} g) identifiziert werden können. Der prinzipielle Aufbau umfasst einen Proben Tisch, einen Ionisator, den Massenanalysator und den Ionendetektor. Die injizierte Probe wird ionisiert, beschleunigt und detektiert.

Es werden fünf grundsätzliche massenspektrometrische Methoden unterschieden. Bei der *Magnetsektor-MS* wirkt auf beschleunigte Ionen orthogonal zur Beschleunigungsrichtung ein elektrisches oder magnetisches Feld. Der Feldeinfluss verändert die Flugbahn von Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis, was in einem räumlichen und zeitlich versetzten Aufprall auf dem Detektor resultiert. Bei der *Quadrupol-MS* wird die ionisierte Probe durch ein elektrisches Feld stark beschleunigt und durch einen Quadrupol-Massenanalysator geführt. Dieser besteht aus vier Metallstäben, auf die verschiedene Feldpotentiale angewandt werden,

sodass nur Ionen mit einem definierten m/z -Verhältnis zu einem Zeitpunkt auf den Detektor treffen. Die *Ion-trap-MS* erweitert die Quadrupol-MS um eine Ringelektrode, durch die alle Ionen in einer Kavität gehalten werden. Durch Variation der Radiofrequenz, mit der die Ringelektrode gesteuert wird, können die „gefangenen“ Ionen entsprechend ihres m/z -Verhältnisses ausgeschleust und detektiert werden. Bei der *time-of-flight-MS* wird ein pulsierender ionisierender Laser oder ein Spannungspuls eingesetzt, um der Ionenbeschleunigung einen definierten Startpunkt zu verleihen. Über elektrostatische Linsen werden die Ionen gerichtet beschleunigt und erfahren nun eine aufgrund ihres m/z -Verhältnisses spezifische kinetische Energie E_{kin} .

$$E_{kin} = z \cdot V = \frac{1}{2}mv^2 \quad (Gl. 2-19)$$

mit: z = Ladung des Ions
 V = Beschleunigungsspannung
 m = Masse des Ions
 v = Geschwindigkeit

Für die Flugzeit t ergibt sich:

$$t = d \cdot \sqrt{\frac{m}{2zV}} \quad (Gl. 2-20)$$

mit: d = Länge des Beschleunigungskanals
 z = Ladung des Ions
 V = Beschleunigungsspannung
 m = Masse des Ions

Ionen mit einem geringen m/z -Verhältnis bewegen sich schneller als Ionen mit einem hohem m/z -Verhältnis. Diese Zeitdifferenz wird am Detektor registriert und in eine entsprechende Masse transformiert. Der Vorteil gegenüber Sektor-MS und Quadrupol-MS besteht in einer höheren Sensitivität, da alle Ionen gleichzeitig detektiert werden können. TOF-MS kann vielfältig modifiziert werden, um Artefakte zu eliminieren und die Sensitivität zu erhöhen. Dazu zählt die *Matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI), bei der eine niedermolekulare Matrix eingesetzt wird, um Proteinfragmente besser zu ionisieren und zerstörungsfrei zu verdampfen.

Bei der *reflectron-mode-MS* wird die lineare TOF-MS erweitert, indem über Linsen der Ionenstrahl um 180° gedreht oder orthogonal zur Beschleunigungsrichtung eingeleitet wird. Dadurch erhöht sich die Flugzeit und dementsprechend die

Fokussierung der Ionen. In der Folge wird das massenspektrometrische Auflösungsvermögen erhöht.

Die *Fourier-transform-MS* funktioniert über ein anderes Prinzip. Die Probe wird ionisiert und in einer Analysenzelle über ein magnetisches Feld B auf eine Kreisbahn gezwungen. Der Radius dieser Kreisbahn ist abhängig vom m/z -Verhältnis. Über einen radiofrequenten Puls werden die Ionen in höhere Kreisbahnen beschleunigt. Die Ionen erzeugen aufgrund ihrer Bewegung auf einer Kreisbahn selbst ein Radiofrequenzsignal, das detektiert und über Fourier-Transformation in ein Massenspektrum umgewandelt wird.

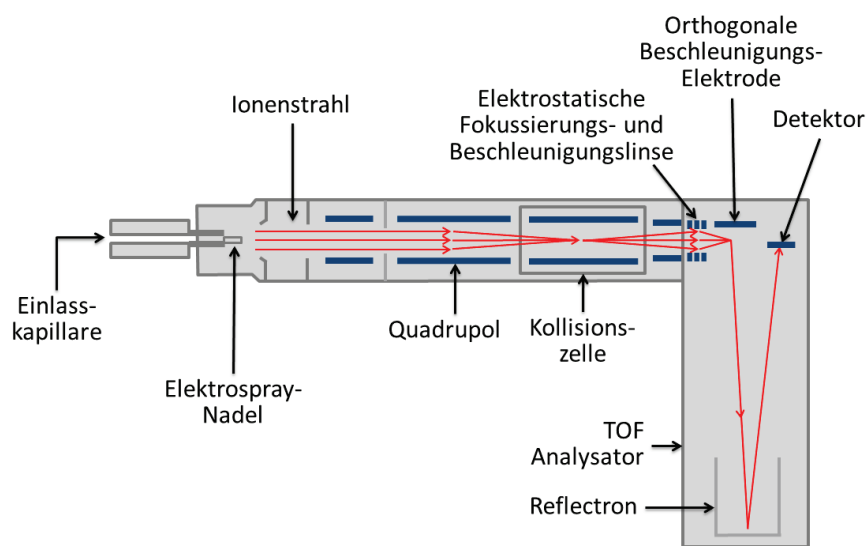


Abb. 2-16: Aufbau eines orthogonalen MALDI-TOF-Massenspektrometers, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde. Modifiziert nach Bengt et al.⁽¹⁵¹⁾

In dieser Arbeit wurde orthogonale-MALDI-TOF im Reflektorenmodus verwendet. Dazu wurde ein Spektrometer (MDS Sciex, Concord, Canada) der AG Biomedizinische Massenspektrometrie am Institut für Hygiene, Münster eingesetzt.

2.2.9 Kontaktwinkelmessungen

Die Kontaktwinkelmessung ist eine Methode zur Bestimmung der Benetzbarkeit einer Oberfläche. Damit können Aussagen darüber getroffen werden, wie hydrophil bzw. hydrophob die Oberfläche ist. Dazu wird ein Tropfen eines Lösungsmittels (meist Wasser) auf eine Oberfläche gegeben. Der zwischen der Phasengrenze Feststoff/Flüssigkeit und Flüssigkeit/Gasphase eingeschlossene Winkel ist als Kontaktwinkel definiert.⁽¹⁵²⁾ Der Tropfen nimmt die energetisch günstigste Konformation ein, sodass bei einer hydrophoben Oberfläche eine Kugelform

entsteht. Der Kontaktwinkel wird dann $> 90^\circ$. Spreitet der Tropfen auf der Oberfläche, so ist der Kontaktwinkel $< 90^\circ$ und die Oberfläche wird als hydrophil bezeichnet.

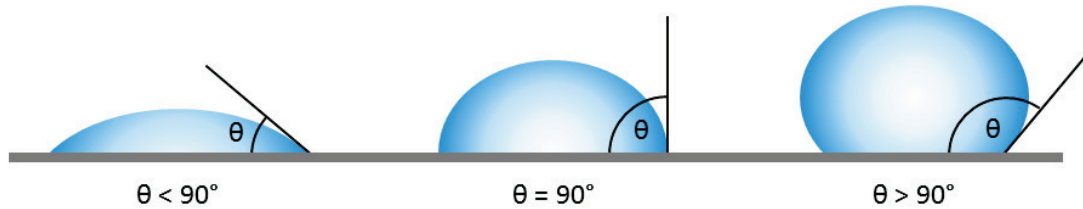


Abb. 2-17: Bestimmung des Kontaktwinkels θ zwischen der Feststoff/Flüssigkeit- und Flüssigkeit/Gas-Phasengrenze.⁽¹⁵²⁾ Ist der Kontaktwinkel $< 90^\circ$, ist die Oberfläche hydrophil. Bei Kontaktwinkeln $> 90^\circ$ besitzt die Oberfläche hydrophoben Charakter.

In dieser Arbeit wurde der Kontaktwinkel gemessen, um die Modelloberflächen hinsichtlich ihrer Benetzbarkeit zu charakterisieren.

2.2.10 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS, engl. X-ray Photoelectron Spectroscopy) ist ein spektroskopisches Verfahren, um die chemische bzw. elektronische Zusammensetzung einer Probe zu ermitteln. Basierend auf dem photoelektrischen Effekt können Photonen (Röntgenquelle) Elektronen aus den inneren Atomorbitalen (Rumpfniveau k) herauslösen. Ist die eingestrahelte Energie $h\nu$ größer als die Bindungsenergie des Elektrons im Vakuum $E_B^{vak}(k)$ und die Austrittsarbeit ϕ_p , verlässt das Elektron die Probe mit der kinetischen Energie E_{kin} .

$$h\nu = E_{kin} + E_B^{vak}(k) \quad (Gl. 2-21)$$

Diese *Photoelektronen* werden emittiert und können mit einem Multiplier und einem Detektor erfasst werden. Je nach Bindungsenergie des Elektrons in der Probe sowie dessen chemischer Umgebung treten im Spektrum charakteristische Emissionslinien auf. Die Bindungsenergie ergibt sich als Differenz der Energien vor und nach Emission des Photoelektrons, bezogen auf das Rumpfniveau k .

$$E_B^{vak}(k) = E_{Ges}^f(k) - E_{Ges}^i \quad (Gl. 2-22)$$

mit: E_{Ges}^i = Gesamtenergie des Atoms im Anfangszustand
 E_{Ges}^f = Gesamtenergie des Atoms nach Emission

Da die exakte Lage des Vakuumniveaus nicht immer bekannt ist, werden die Bindungsenergien auf das Fermi-niveau bezogen. Außerhalb der Probe besitzt das Photoelektron dann folgende kinetische Energie:

$$E_{kin} = h\nu - E_B^{Fermi} - \phi_p \quad (Gl. 2-23)$$

Tritt das Photoelektron in das Spektrometer ein, wirkt die Potentialdifferenz $\phi_{Spek} - \phi_p$ beschleunigend auf das Photoelektron. Die Bindungsenergie ist demnach unabhängig von der Austrittsarbeit aus der Probe. Es gilt:

$$E_B^{Fermi} = h\nu - E_{kin} - \phi_{Spek} \quad (Gl. 2-24)$$

Über die mittlere freie Weglänge λ kann die Informationstiefe der XPS bestimmt werden. Die mittlere freie Weglänge hängt von der kinetischen Energie der Elektronen ab und beträgt ca. 10 – 20 Å. In einem XPS-Spektrum wird die Zählrate (in s⁻¹) gegen die Bindungsenergie (in eV) aufgetragen.

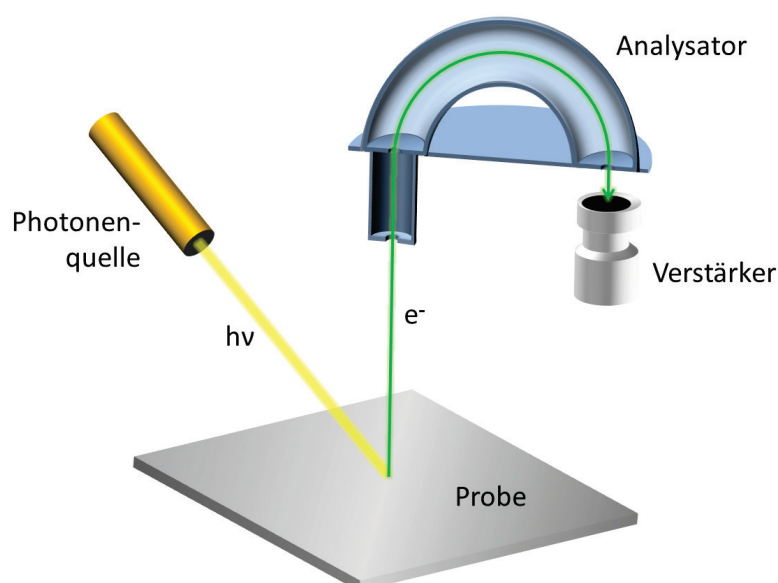


Abb. 2-18: Messprinzip eines XPS-Spektrometers.

Die Messungen wurden mit dem Synchrotron BESSY II am Helmholtz-Zentrum in Berlin gemessen.

2.2.11 Biotinylierung von Proteinen

Die Biotinylierung von Proteinen kann mit kommerziellen Biotinylierungsreagenzien durchgeführt werden. Dazu gibt es verschiedene funktionelle Gruppen, an denen das Biotin in einem Protein eingeführt werden kann. Proteine bestehen

aus polykondensierten Aminosäuren, die verschiedene reaktive Reste besitzen. Lysine trägt primäre Amingruppen, Glutamat oder Aspartat Carboxylgruppen und Cystein Sulfhydrylgruppen. Diese Gruppen können mit entsprechenden Reagenzien nukleophil angegriffen werden. Primäre Amine reagieren mit einem Biotin-NHS-Ester, Carboxylgruppen mit einer an Biotin gekoppelten Aminogruppe und EDC unter Ausbildung einer Amidbindung. Sulfhydrylgruppen können mit Maleimid-, Iodoacetyl- oder Pyridyldisulfid-gekoppeltem Biotin unter Ausbildung eines Thioethers oder einer Disulfidbrücke biotinyliert werden.

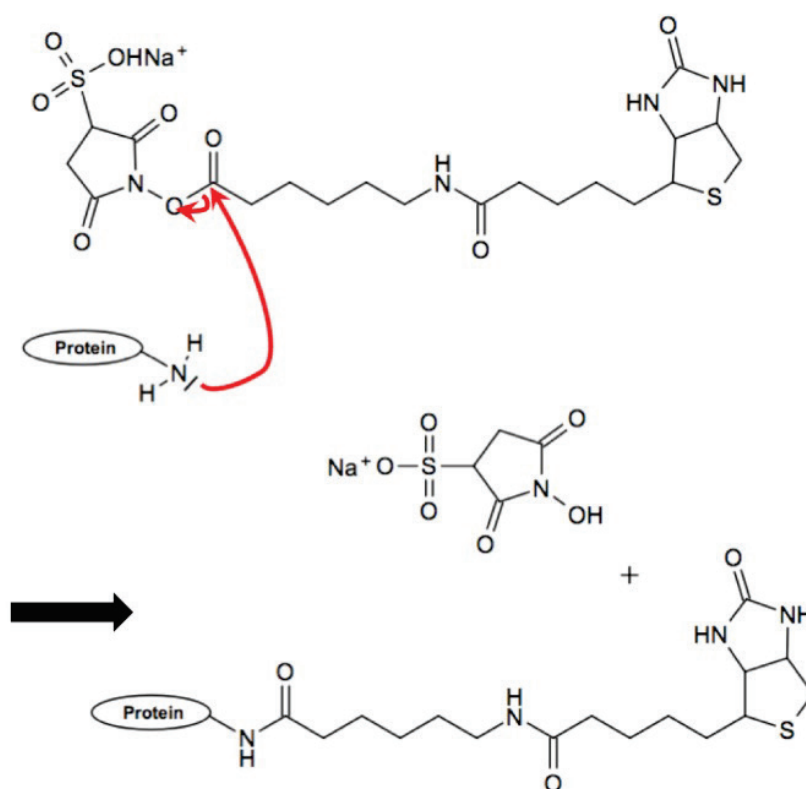


Abb. 2-19: Reaktion von Sulfo-NHS-LC-Biotin mit einer Lysinseitenkette eines Proteins. Das Biotin wird unter Ausbildung einer Amidbindung und Abspaltung der Sulfo-NHS-Gruppe an die Seitenkette gebunden.

Darüber hinaus weisen manche Proteine ein spezifisches Glykosylierungsmuster auf, an dessen Aldehydgruppen unter Ausbildung einer Hydrazonbindung ein Biotinderivat gekoppelt werden kann. Auch photoaktivierbare Azido-Biotin-reagenzien können zur Biotinylierung von Proteinen verwendet werden.

Proteine mit katalytischer Aktivität, Rezeptoren oder Wachstumsfaktoren besitzen definierte Aminosäurereste, die für die biologische Aktivität essentiell sind. Diese dürfen nicht biotinyliert werden, sonst verlieren sie ihre Aktivität. Dies ist bei der Biotinylierung zu berücksichtigen.

Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, ist die rekombinante Herstellung des gewünschten Proteins. Dabei wird molekularbiologisch eine Sequenz eingefügt, die nachfolgend von einer Biotin-Ligase erkannt wird und spezifisch dort ein Biotin anfügt. Nachteil ist der große Aufwand, den die Herstellung eines solchen rekombinanten Proteins erfordert. Zudem ist oft nicht abzuschätzen, welche Auswirkungen die veränderte Sequenz auf die Löslichkeit, Aufreinigung und biologische Aktivität hat. Viele eukaryontische Proteine weisen ein spezifisches Glykoyslierungsmuster auf, welches nur durch rekombinante Herstellung in höheren eukaryotischen Systemen mit geringer Ausbeute hergestellt werden kann. Die Aktivität muss anschließend mit entsprechenden Tests überprüft werden. Der damit verbundene Aufwand hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Daher wurden einfache Biotinylierungsstrategien mit aminoreaktiven Biotinylierungsreagenzien (Abb. 2-19) eingesetzt.

2.2.12 Bestimmung des Biotinylierungsgrades

Eine quantitative Bestimmung der Anzahl an konjugierten Biotinen kann mit einem HABA-Assay durchgeführt werden. Dieser Assay beruht auf einer Verdrängungsreaktion von HABA (4'-hydroxyazobenzol-2-carboxylsäure) durch Biotin und der daraufhin detektierbaren Fluoreszenz.⁽¹⁵³⁾ Ist die Proteinkonzentration bekannt, so kann die Anzahl der Biotine pro Protein (DOL, *degree of labelling*) berechnet werden:

$$DOL = \frac{n(\text{Biotin})}{n(\text{Protein})} \quad (Gl. 2-25)$$

Dabei wird ein Chromophor-konjugiertes Streptavidin eingesetzt. Dieses besitzt ein Absorptionsmaximum bei 485 nm Anregungswellenlänge und ändert daraufhin seine Konformation. Dadurch wird ein Teil der Anregungsenergie absorbiert, das emittierte Licht ist deshalb zu etwas höheren Wellenzahlen (530 nm) verschoben (Stokes-Shift). Solange HABA in den Bindungstaschen des Streptavidin gebunden ist, löscht dieses die Fluoreszenz aus. Verdrängt nun Biotin durch die höhere Affinität zu Streptavidin HABA aus der Bindungstasche, so wird das Licht frei emittiert (Abb. 2-20). Die detektierte Fluoreszenz ist in erster Näherung proportional zur eingesetzten Biotinmenge.

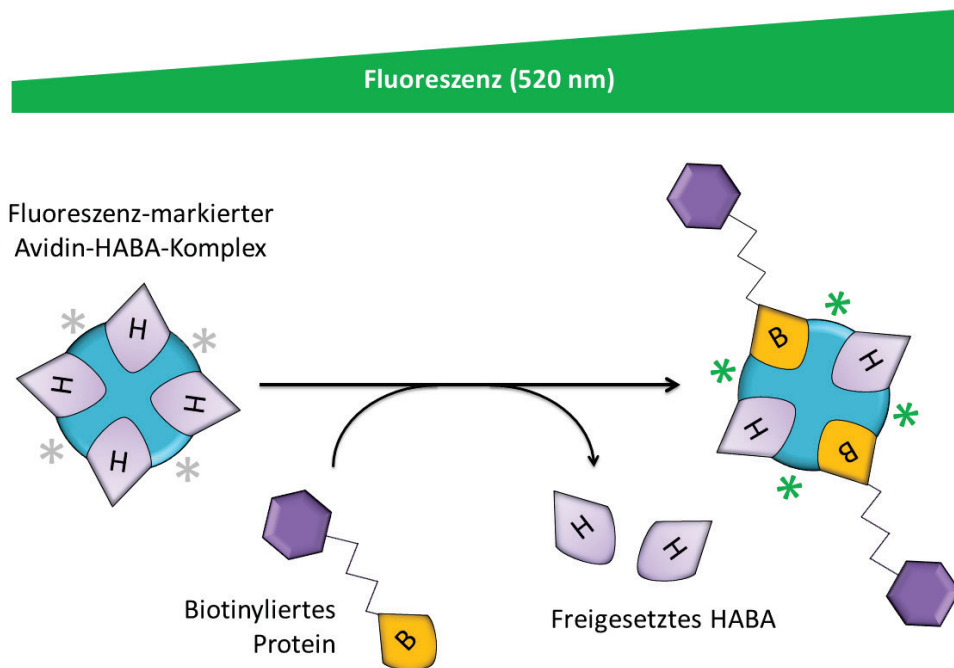


Abb. 2-20: Prinzip eines Fluoreszenzassays, basierend auf der Verdrängung von HABA aus den Bindungstaschen von Streptavidin durch Biotin.

2.2.13 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist ein elektrophoretisches Trennverfahren zur molekulargewichtsspezifischen Proteinauftrennung. Da Proteine geladene Moleküle sind, wandern sie in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit v ergibt sich aus:

$$v = \frac{qE}{f} \quad (\text{Gl. 2-26})$$

mit: q = Ladung des Proteins
 E = elektrische Feldstärke
 f = Reibungskoeffizient der Lösung.

In den Reibungskoeffizienten fließen das Molekulargewicht und die Form des Proteins sowie die Viskosität der umgebenden Lösung ein. Die Auftrennung von Proteinen erfolgt in einem Polyacrylamidgel, welches durch seinen Siebeffekt die Wanderungsgeschwindigkeit großer Proteine verringert. Die unterschiedlich starke Ladung der Proteine wird durch vorhergehende Denaturierung mit dem anionischen Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) bei 95 °C abgeschirmt, sodass elektrostatische Wechselwirkungen des Proteins mit dem Polyacrylamid oder untereinander nicht möglich sind. Durch Anlegen einer Spannung wandern die mit SDS umhüllten Proteine zur Kathode und erfahren dabei im Gel eine Auffächerung in verschiedene

Banden aufgrund ihrer Massendifferenz. Durch Färbung können diese Banden sichtbar gemacht werden.

2.2.14 Western Blot

Nachdem eine Proteinprobe in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, können einzelne Proteine sichtbar gemacht werden. Dazu werden die Proteine durch ein elektrisches Feld orthogonal zur Geloberfläche aus dem Gel auf eine hydrophobe Membran (meist aus Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid, PVDF) übertragen.^{(154),(155)} Dies kann im „wet“, „semi-dry“ oder „dry“-Modus geschehen, die sich jeweils an Menge des zugesetzten Blotpuffers unterscheiden. Dabei wird das Gel auf die Membran gelegt. Durch den konstanten Stromfluss wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine zur Anode. Sind die Proteine auf die stabile und reaktionsinerte Membran übertragen, behindern Diffusionsprozesse Detektionsreaktionen nicht mehr. Durch Zugabe von Antikörpern oder Farbstoffen können hochspezifisch Proteine oder Modifikationen an Proteinen (z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung) nachgewiesen werden.⁽¹⁵⁶⁾ In dieser Arbeit wurde der Western Blot hauptsächlich eingesetzt, um an Proteinen eingeführte Biotinylierungen nachzuweisen.

2.2.15 Proteinverdau

Beim Proteinverdau wird ein Protein enzymatisch in Abhängigkeit von der Schnittsequenz in definierte Fragmente gespalten. Diese Fragmentierung eines Proteins ist u. a. wichtig für die Identifikation in massenspektrometrischen Analysen. Durch die spezifische Fragmentierung und die Detektion dieser Fragmente im Massenspektrometer können z. B. ins Protein eingeführte Modifikationen sehr spezifisch detektiert werden. Für die enzymatische Fragmentierung kann eine Vielzahl von sequenzspezifischen Proteasen eingesetzt werden. Am häufigsten wird hierfür die Serinprotease Trypsin verwendet. Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch am Carboxyende der Aminosäuren Lysin und Arginin. Serinproteasen besitzen eine katalytische Triade aus Asparaginsäure, Serin und Histidin. Der Sauerstoff der Hydroxygruppe des Serins greift nukleophil den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung an, wodurch diese Bindung gespalten wird.⁽¹⁵⁷⁾

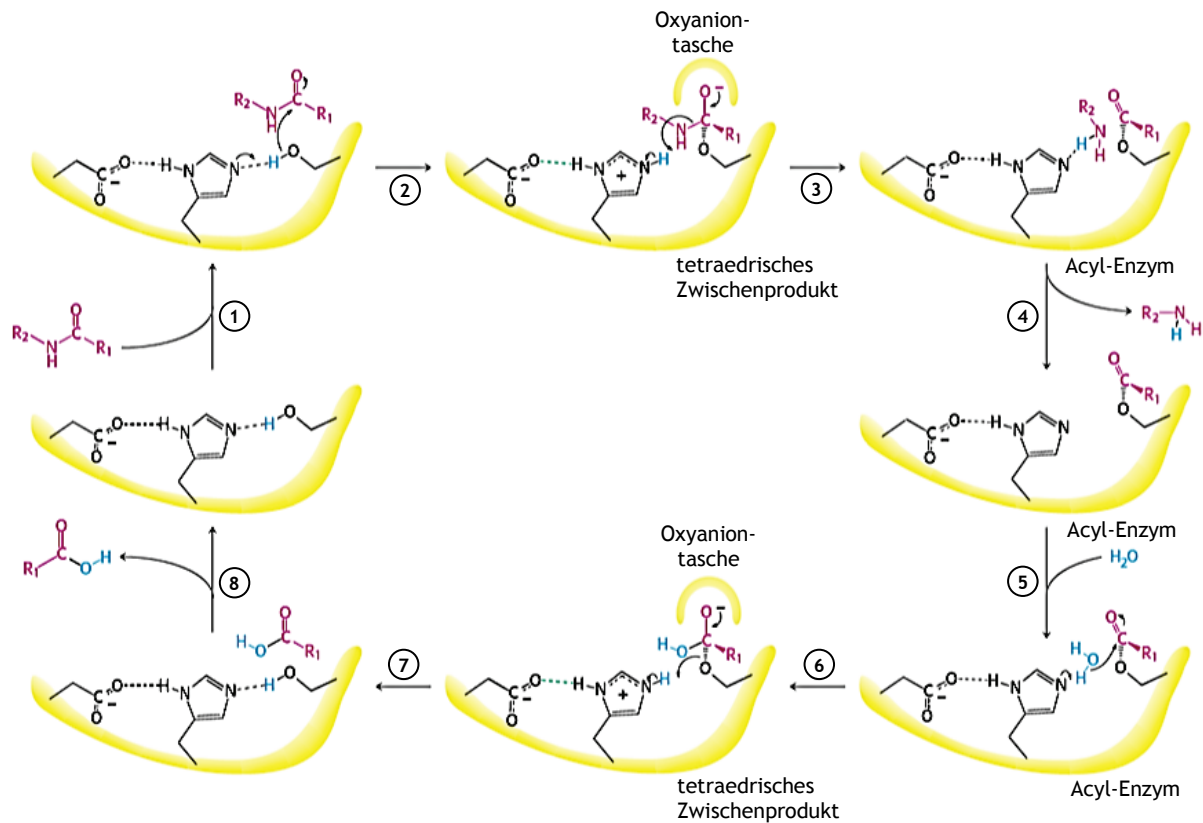


Abb. 2-21: Katalytische Triade und Spaltung einer Peptidbindung in Serinproteasen.⁽¹⁵⁷⁾

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Serinprotease Trypsin eingesetzt, um die Position einer im Wachstumsfaktor BMP-2 eingeführten Biotinylierung genau zu bestimmen. Da die Biotinylierung nur an Lysin möglich ist, besteht im Falle einer Spaltung eines auf diese Art biotinylierten Proteins eine Barriere für die Protease Trypsin. Diese kann mithilfe der Massenspektrometrie detektiert werden.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die Proteinspaltung auch zur Untersuchung der Stabilität von Streptavidin-Biotin-Komplexen an Oberflächen eingesetzt. Hierzu wurde neben Trypsin auch die Serinprotease Proteinase K aus dem Pilz *Engyodontium album* eingesetzt, die Peptidbindungen unabhängig vom Aminosäuremuster spaltet. Damit werden üblicherweise Proteine vollständig hydrolysiert.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Präparation von TiO_x -biofunktionalisierten Modelloberflächen

3.1.1 Präparation und Charakterisierung von TiO_x -Modelloberflächen

Hochfrequenz-Magnetron-Sputtering

Die Modelloberflächen aus TiO_x müssen für die Analytik mit verschiedenen biophysikalischen Methoden (SPR, IRRAS, AFM, Ellipsometrie) zugänglich sein. Daher scheiden Implantate aufgrund ihrer Größe aus. Mittels *Rf-Magnetron-Sputtering* können aber ultradünne Schichten auf Oberflächen abgeschieden werden, die sich in ihren Oberflächeneigenschaften nicht von Implantatoberflächen unterscheiden. Zudem kann mit Sputtering eine Zwischenschicht aus Gold aufgebracht werden, die für Untersuchungsmethoden wie SPR und IRRAS erforderlich ist. Nur hochempfindliche Analytik wie SPR und IRRAS ermöglicht die genaue Beobachtung von molekularen Adsorptionsprozessen an Oberflächen, was für die vorliegende Zielsetzung nötig ist.

Für die Modelloberflächen wurden hochbrechende $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ LaSFN9-Glasträger (Resonant Technologies, Framersheim) 20 min in 2 % Hellmanex-III-Lösung (Hellma Analytics, Müllheim) unter Ultraschall gereinigt, anschließend dreimal 8 min in destilliertem Wasser mit Ultraschall behandelt und danach 10 min in absolutem Ethanol (Merck Millipore, Darmstadt) inkubiert. Direkt danach wurden die Glasträger im Argonstrom getrocknet und unter Schutzgas gelagert. Zuerst wurde eine 1.5 nm dicke Chromschicht als Haftvermittler aufgebracht, bevor eine 50 nm dicke Goldschicht aufgedampft wurde (Edwards FL Auto 306, München). Die anschließend unter 30 sccm (standard cubic centimeter per minute) Sauerstoffpartialdruck aufgesputterte (125 W, 15 min) TiO_2 -Schicht (Edwards Auto 500, München) besaß eine Schichtdicke von 5 nm. Bei Magnetronsputtern von TiO_2 unter einem definierten Sauerpartialdruck entsteht stöchiometrisch TiO_x mit $x \approx 2$.⁽¹⁵⁸⁾ Daher werden die so aufgetragenen Schichten im Folgenden mit TiO_x bezeichnet. Sämtliche Sputteringprozesse in dieser Arbeit wurden vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz durchgeführt.

Schichtdickenmessung mit SPR

Die Adsorption von Molekülen an die Modelloberflächen wurde in einem SPR Spektrometer in *Kretschmann-Konfiguration* (RT 2005, Resonant Technologies, Framersheim) in Echtzeit verfolgt. Dieses Spektrometer besitzt einen 632.8 nm HeNe-Laser (JDS *Uniphase* 1125p). Über eine optische Bank mit Chopper, Spiegel und Polarisatoren wird *p*-polarisiertes Licht erzeugt, welches auf die in der Messzelle fixierte Oberfläche fällt. Die beiden Messarme des Doppelgoniometers (Huber Diffractionstechnik GmbH, Rimsting) können über die Software *Wasplas* angesteuert werden. Das Reflektivitätssignal wurde über einen Lock-in-Amplifier (*Signal Recovery* 7265 DSP Lock-in-Amplifier, MountainPhotonics GmbH, Landsberg am Lech) verstärkt. Die besputterten Glasträger wurden mit der zu beschichtenden Seite auf eine Teflon-Messzelle (50 μ L Volumen) gelegt, darauf wurde dann ein Tropfen eines hochbrechenden Indexöls (Cargille Series B, $n=1.700$) gegeben und ein LaSFN9-Prisma (Resonant Technologies, Framersheim) fixiert. Nach Einbau der Messzelle in die optische Bank und anschließender Kalibrierung wurden die Messintervalle definiert und ein SPR-Scan jeweils vor und nach Adsorption des Adsorbats durchgeführt. Dabei wurde im Bereich der Totalreflexionskante und des Resonanzminimums ein Winkelintervall von 0.05° gewählt. Die Adsorption von Molekülen konnte in Echtzeit verfolgt werden, indem die Reflektivität bei einem konstanten Winkel ca. 1.5° vor dem Resonanzminimum über ein definiertes Zeitintervall aufgezeichnet wurde. Für die Messung der Adsorption von Molekülen wurde die Messzelle mit dem Lösungsmittel befüllt und für 5 min äquilibriert. Nach Zugabe des Adsorbats wurde die Adsorption für 45 min aufgezeichnet, anschließend mit dem Lösungsmittel gespült und für 5 min äquilibriert. Die Auswertung der Scandaten geschah mit der Software *Winspill* (vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) durch Fitting an Lösungen der Fresnel-Gleichungen für das jeweilige Schichtsystem unter Verwendung der in Tabelle 3-1 angegebenen Parameter der experimentell ermittelten Scandaten.

Tabelle 3-1: Parameter, die in der Software Winspall für die Fits der Scandaten verwendet wurden.⁽¹⁵⁹⁾

| <i>Schicht</i> | Realteil der Dielektrizitätskonstante ϵ_r | Imaginärteil der Dielektrizitätskonstante ϵ_i |
|------------------------------------|--|--|
| <i>LaSFN9</i> | 3.4225 | 0 |
| <i>Chrom</i> | -6.3 | 7 – 15 |
| <i>Gold</i> | -12.28 | 1.30 – 1.5 |
| <i>Titandioxid</i> | 5.37 | 0 |
| <i>AHAPTMES mit Biotin</i> | 2.1025 | 0 |
| <i>Streptavidin (SAv)</i> | 2.25 | 0 |
| <i>Fibronektin (Fn)</i> | 1.96 | 0 |
| <i>BMP-2</i> | 2.05 | 0 |
| <i>BMP-2/6</i> | 2.05 | 0 |
| <i>FGF-2</i> | 2.05 | 0 |
| <i>Bovines Serum Albumin (BSA)</i> | 2.25 | 0 |
| <i>Lysozym (LYM)</i> | 2.05 | 0 |
| <i>Reinstwasser</i> | 1.77 | 0 |
| <i>Phosphatpuffer (PBS)</i> | 1.79 | 0 |

Schichtdickenmessung mit Ellipsometrie

Für die Schichtdickenmessung mittels Ellipsometrie wurde ein Gerät der Firma Rudolph Research genutzt (AutoEL-II Ellipsometer, Rudolph Research Analytical, Hackettstown, USA). Die Messungen erfolgten gegen Luft. Für die Auswertung wurden das in der Messung erhaltenen Amplitudenverhältnis der p- und s-Komponenten des reflektierten Strahls (Ψ) und die Phasenverschiebung (Δ) in die Software *DAFIBM87* eingegeben und anhand eines geeigneten Modells zur Berechnung der Schichtdicke herangezogen.

Vor einer Messung wurde das Gerät entsprechend der Anleitung justiert und ein Referenzwafer (A9291, Rudolph Research, Flanders, USA) mit definierter Oxidschichtdicke ($1185 \pm 3 \text{ \AA}$, $n = 1.459$) vermessen. Für die Auswertung wurde in der Software ein *Single-Layer-Model* entsprechend Tabelle 3-2 herangezogen.

Tabelle 3-2: Single-layer-model für die Auswertung komplexer Schichtsysteme mit der Software DAFIBM87.⁽¹⁵⁹⁾

| Schicht | Brechungsindex n | Absorptionskonstante k |
|-------------|--------------------|--------------------------|
| Luft | 1.001 | 0 |
| Oxidschicht | 1.459 | 0 |
| Substrat | 3.882 | 0.019 |

Das Substrat ($1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$) (1,0,0) Si-Wafer (WSI04-1002001, Active Business Company) wurde im Ultraschallbad in 2 % Hellmanex-Lösung für 15 min aufgereinigt und anschließend zehnmal mit Reinstwasser gespült und im Argonstrom getrocknet. Danach wurde die Oxidschichtdicke des zu messenden Substrats bestimmt, bevor auf dem Substrat entsprechend Abschnitt 3.1.2 das molekulare Schichtsystem aufgebaut wurde. Nach jedem Beschichtungsschritt wurde das Amplitudenverhältnis der p- und s-Komponenten des reflektierten Strahls (Ψ) und die Phasenverschiebung (Δ) bestimmt und in der Software mit einem *Double-Layer-Model* entsprechend Tabelle 3-3 ausgewertet.

Tabelle 3-3: Double-Layer-Model für die Auswertung komplexer Schichtsysteme mit der Software DAFIBM87.⁽¹⁵⁹⁾

| Schicht | Brechungsindex n | Absorptionskonstante k | Schichtdicke $L [\text{\AA}]$ |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Luft | 1.000 | 0 | ∞ |
| angrenzende Schicht y | n_y | k_y | L_y |
| Oxidschicht | 1.450 | 0 | 18 |
| Substrat | 3.882 | 0.019 | ∞ |

Messung des Kontaktwinkels

Der Kontaktwinkel wurde mit einem OCA15 (Dataphysics Instruments, Filderstadt) und jeweils $1.5 \mu\text{L}$ Tropfenvolumen Reinstwasser bestimmt. Es wurden jeweils zehn Messwerte auf einem unter Argonatmosphäre gelagertem Träger ermittelt. In der Auswertungssoftware *OCA* wurde die Tropfenkontur mit zehn Punkten und einer Baseline angeglichen und der eingeschlossene Winkel automatisch bestimmt.

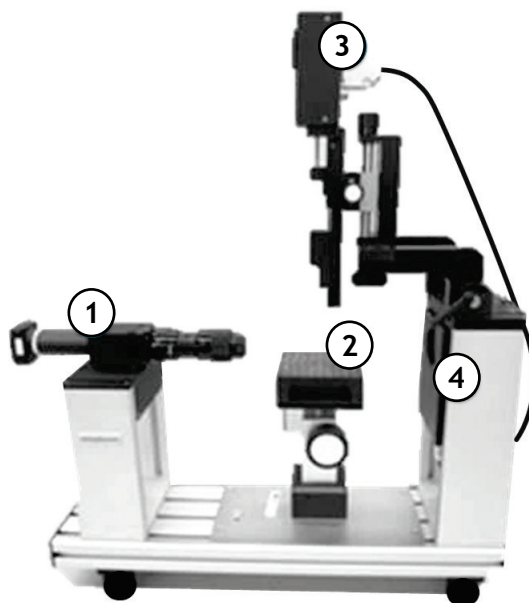


Abb. 3-1: Kontaktwinkelmessgerät OCA15 der Fa. Dataphysics. Das Gerät enthält eine Kamera (1), mit der das Bild in Echtzeit aufgenommen wird, einen justierbaren Objektisch (2), eine automatische Dosiersteuerung (3) und eine Lichtquelle (4) entgegengesetzt zu der Kamera.

Spektroskopische Charakterisierung

FT-IRRAS

Die FTIR-Spektren wurden mit einer IRRAS-Anordnung aufgenommen. Dazu wurde in ein *Bruker Vertex 70* eine 80° Reflektionseinheit mit streifendem Einfall (*A518*, Bruker, Ettlingen) ohne Polarisationsfilter eingebaut. Als Referenz wurde ein mit 1.5 nm Chrom und 50 nm Gold bedampfter Glasträger verwendet. Die Probenkammer wurde geschlossen und 30 min mit N₂ begast, um atmosphärisches Wasser und CO₂ zu entfernen. Die Spektren der Proben wurden unter den in Tabelle 3-4 genannten Parametern aufgenommen.

Tabelle 3-4: Parameter für die FT-IRRAS Messungen mit der Reflektionseinheit A518.

| <i>Parameter</i> | <i>zugewiesener Wert</i> |
|-------------------------------|--|
| <i>Auflösung</i> | 4 cm ⁻¹ |
| <i>Messzeit</i> | 220 Scans |
| <i>Messbereich</i> | 4000 cm ⁻¹ – 850 cm ⁻¹ |
| <i>Apertur</i> | 6 mm |
| <i>Spiegelgeschwindigkeit</i> | 20 kHz |
| <i>Phasenauflösung</i> | 32 |
| <i>Phasenkorrektur</i> | Mertz |
| <i>Apodisationsfunktion</i> | Blackman-Harris 3-Term |
| <i>Zerofilling-Faktor</i> | 4 |

Sofern möglich, wurden drei Spektren aufgenommen und ein Mittelwertspektrum erstellt.

Nach Aufnahme der Spektren wurden diese analysiert, indem eine Grundlinienkorrektur mit der zugehörigen Software *OPUS* (Bruker, Ettlingen) mithilfe der konkaven Gummibandmethode in mindestens 10 Iterationen bei 64 Grundlinienpunkten durchgeführt wurde. Zudem wurde eine in der Software implementierte atmosphärische Korrektur durchgeführt, bei der mögliche störende Hintergrundsignale durch Reste von CO₂ oder Wasserdampf eliminiert wurden.

UV-VIS-Spektroskopie

Die spektrale Charakterisierung von TiO_x-Modelloberflächen wurde in einem *Specord 210* UV-VIS-Spektrometer (Analytik Jena, Jena) durchgeführt. Die Messküvette wurde dabei durch ein Peltierregler auf konstanter Temperatur (25 °C) gehalten. Für die Messungen wurden 1.5 x 0.5 cm² BK7-Glasträger nur mit TiO_x besputtert und mit den in Tabelle 3-5 angegebenen Parametern vermessen. Als Referenz wurde ein unbeschichteter BK7-Glasträger im Strahlengang positioniert und die Absorption bestimmt.

Tabelle 3-5: Parameter für die UV-VIS-Messungen mit dem Specord 210 Spektrometer.

| <i>Parameter</i> | <i>Zugewiesener Wert</i> |
|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Spalt</i> | 1 nm |
| <i>Geschwindigkeit</i> | 50 nm s ⁻¹ |
| <i>Spektrale Auflösung</i> | 1 nm |
| <i>Wellenlängenbereich</i> | 200-800 nm |
| <i>Lampenwechsel</i> | Halogen |
| <i>Temperatur</i> | 25 °C |

3.1.2 Silanisierung, Biotinylierung und Chemisorption von Streptavidin auf TiO_x

Der Aufbau des molekularen Schichtsystems basierte auf den Vorarbeiten des Arbeitskreises Biophysik ^{(16),(17),(19)–(22)} und wurde nur geringfügig modifiziert.

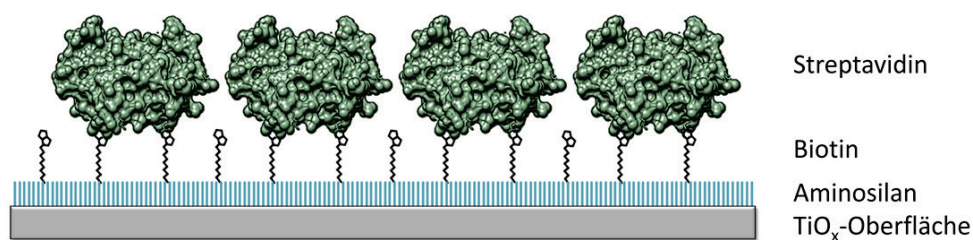


Abb. 3-2: Molekulares Schichtsystem auf TiOx.

Die TiO_x-Modellschichten wurden dreimal in absolutem Methanol gespült, gefolgt von 60 min Inkubation in einer 0.5 mM Lösung von N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan (AHAPTMS, AB110807, ABCR, Karlsruhe) in Methanol. Als nächstes wurde die Oberfläche dreimal mit absolutem Methanol und anschließend mit absolutem Ethanol gespült, um ungebundene Moleküle zu entfernen. Zur Biotinylierung der Oberfläche wurde eine 0.5 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung (21335, ThermoScientific, Darmstadt) in einem Ethanol:Wasser-Gemisch (90:10 – v/v) gelöst. Dazu wurde die entsprechende Menge Biotin zuerst in Reinstwasser gelöst und im Anschluss das Ethanol zugefügt, da die Löslichkeit in reinem Ethanol deutlich verringert ist. Nach 120 min Inkubation wurde die Oberfläche erneut fünfmal mit absolutem Ethanol gespült, um ungebundene Moleküle zu entfernen. Danach wurde das Lösungsmittel zu PBS (P4417, Sigma-Aldrich, Schnelldorf) gewechselt und die Oberfläche dreimal mit PBS gespült. Die Adsorption einer 750 nM Streptavidinlösung (A1495, AppliChem, Darmstadt) an die biotinylierte Oberfläche wurde nach 45 min durch Spülen mit PBS gestoppt und nichtgebundene Moleküle entfernt.

3.2 Eigenschaften des molekularen Schichtsystems

3.2.1 Unterdrückung nicht-spezifischer Proteinadsorption

Für die Untersuchung der antiadhäsiven Eigenschaften des molekularen Schichtsystems wurde auf einer Modelloberfläche entsprechend Abschnitt 3.1.2 ein Streptavidinmonolayer aufgebaut. Physiologisch konzentrierte Proteinlösungen von 60 mg mL⁻¹ aus BSA (1.12018.0025, Merck Millipore, Darmstadt) und Lysozym (1.05281.0010, Merck Millipore, Darmstadt) wurden in 0.1 M PBS angesetzt. Vor Beginn und nach der Kinetikmessung wurde ein SPR-Scan der Oberfläche in PBS

durchgeführt. Als Referenz wurde die Adsorption von 60 mg mL^{-1} BSA und Lysozymlösung auf einer nativen TiO_x -Oberfläche aufgezeichnet.

Als Referenzstandard für die Unterdrückung nicht-spezifischer Adsorption gelten PEG-funktionalisierte Oberflächen.⁽¹⁶⁰⁾ Daher wurde die Adsorption der hochkonzentrierten BSA- und Lysozymlösungen auf einer PEG-funktionalisierten Oberfläche untersucht. Dazu wurden auf LaSFN9-Trägern entsprechend Abschnitt 3.1.1 1.5 nm Chrom und 50 nm Gold aufgedampft. Als nächstes wurde die Goldoberfläche mit einem PEG-Substrat beschichtet, indem 11-mercaptoundecylhexa(ethylenglykol)⁽¹⁶¹⁾ (SPT-0011P6, SensoPath, Bozeman, USA) aus absolutem Ethanol innerhalb von 60 min entsprechend Herstellerangaben mit einem Self-Assembly-Prozess aufgebracht wurden. Danach wurde die Adsorption der hochkonzentrierten Proteinlösung mit einer SPR-Kinetik und anschließendem SPR-Scan aufgezeichnet. Die Auswertung geschah mit der Software *WinSpall*. Dabei wurde für den chemisorbierten PEG-Monolayer ein Brechungsindex von 1.45 angenommen.⁽¹⁶²⁾

3.2.2 Unterdrückung nicht-spezifischer und spezifischer Adsorption von Bakterien

Für die Untersuchung der Unterdrückung bakterieller Adsorption von Bakterien mit unspezifischen und spezifischen Adsorptionsmechanismen sowie oral-pathogener Relevanz (Spezifikationen siehe Tabelle 3-6) wurde ein experimenteller Aufbau von Haldar et al. getestet und modifiziert.⁽¹⁶³⁾ Hierbei wurden beschichtete Glasträger unter einer Sterilwerkbank durch einem Zerstäuber mit der entsprechenden Bakterienlösung eingesprüht. Nach Vorarbeiten stellte sich aber heraus, dass auf diese Art und Weise keine gleichmäßige Besiedlung mit koloniebildenden Einheiten (CFU, *Colony Forming Units*) möglich ist. Daher wurde der Aufbau entsprechend Abb. 3-3 modifiziert.

Tabelle 3-6: Herkunft und Spezifikation der verwendeten bakteriellen Spezies.

| Spezies | Spezifikation | Hersteller | Ort |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------|
| <i>Escherischia coli</i> | W397E, ATCC 9637 | LGC Standards GmbH | Wesel |
| <i>Bacillus subtilis</i> | DSM 1090 | DSMZ | Braunschweig |
| <i>Streptococcus intermedius</i> | AC 3105 | Stammsammlung Universität Aachen | Aachen |

Mit TiO_x besputterte $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ BK-7-Glasträger (Menzel, Braunschweig) wurden für 30 min in absolutem Ethanol desinfiziert und anschließend dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Die Hälfte der Träger wurde entsprechend Abschnitt 3.1.2 mit Streptavidin biofunktionalisiert. Die Biofunktionalisierung wurde mit IRRAS und SPR überwacht. Anschließend wurden die Träger bei 37°C für 30 min bei 50 rpm in Petrischalen mit 10 mL der entsprechenden Bakterienlösung ($1 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$) in einen Schüttelinkubator (Certomat R, B. Braun Avitum AG, Melsungen und N-Biotek N8-205L, Dunn Labortechnik, Asbach) gegeben. Die Bakterienvorkultur und ihre Applikationskonzentration wurden für die optische Auswertung mittels Koloniezählung für jede bakterielle Spezies entsprechend Tabelle 3-7 optimiert.

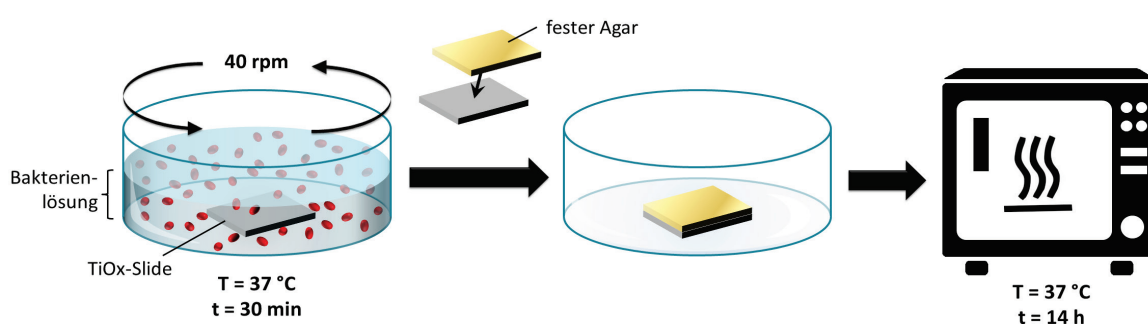


Abb. 3-3: Fließschema für den experimentellen Aufbau zum Test der bakteriellen Adsorption.

Nach dem bakteriellen Adsorptionsprozess wurden die Träger kurz in PBS getaucht und anschließend unter der Sterilwerkbank getrocknet. Feste $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ Agarscheiben (A0949, AppliChem, Darmstadt) wurden auf die Träger gedrückt und bei 37°C und 5 % CO_2 mindestens 14 h inkubiert (Memmert, Schwabach). Anschließend wurden die Agarscheiben entfernt und die Bakterienkolonien an fünf Stellen mit einem Laserkonfokalmikroskop (INM 200, Leica, Wetzlar) gezählt.

Die antibakterielle Wirkung von Streptavidin auf *E. coli* wurde mit einem Hemmhoftest bei Streptavidin-Konzentrationen von $10^{-15} - 1 \text{ mM}$ getestet.

Tabelle 3-7: Parameter für die Kultur und Inkubation der verschiedenen Bakterienstämme.

| Parameter | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>S. intermedius</i> |
|-------------------------|--|--|---|
| <i>Konzentration</i> | 1 x 10 ⁸ cfu mL ⁻¹ | 1 x 10 ⁸ cfu mL ⁻¹ | 1 x 10 ⁴ cfu mL ⁻¹ |
| <i>Kulturmedium</i> | Yeast Dextrose Agar X929, Carl Roth | Yeast Dextrose Agar X929, Carl Roth | Brain Heart Infusion |
| <i>Dauer Vorkultur</i> | 8 h | 9 h | 24 h |
| <i>agar</i> | A0949, Applichem | A0949, Applichem | BHI + 1.5 % Agar technical. No 3., ThermoFisher |
| <i>Inkubationsdauer</i> | 14 h | 14 h | 48 h |

3.2.3 Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau

Die Stabilität eines Streptavidinmonolayers gegenüber Proteasen wurde mit einem proteolytischen Verdau durch Proteinase K in Echtzeit untersucht. Dazu wurden TiO_x-Modelloberflächen entsprechend Abschnitt 3.1.2 mit Streptavidin biofunktionalisiert. Die Adsorption wurde mittels SPR-Scan vor und nach der Adsorption von Streptavidin verfolgt. Proteinase K (P6556, Sigma-Aldrich, Darmstadt) wurde in 1 mM CaCl₂-Lösung auf eine Konzentration von 7.5 nM eingestellt. Diese Lösung wurde auf die adsorbierte Streptavidinmonolage gegeben. Mit einer Echtzeitkinetik wurde über Nacht bei 37 °C die Veränderung der Streptavidinschicht verfolgt. Nach 14 h wurde mit PBS gespült, ein SPR-Scan gemessen und die Daten mit der Software *WinSpall* anhand der Fresnel-Gleichungen angepasst.

Zum Vergleich wurde gelöstes Streptavidin ebenfalls einem Verdau mit Proteinase K und Trypsin unterzogen und mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden je 4 µg Streptavidin in einem Verhältnis von 1:100 (Proteinase K, 1 mM CaCl₂) und 1:20 (Trypsin) über Nacht bei 37 °C (Proteinase K) und 37 °C (Trypsin) verdaut. Zusätzlich wurde der Verdau von gelöstem Streptavidin in Anwesenheit eines 10-fach molaren Biotinüberschusses entsprechend getestet. Als letzte Vergleichsgruppe wurde gelöstes Streptavidin in Anwesenheit und Abwesenheit eines 10-fach molaren Biotinüberschusses für 10 min bei 95 °C erhitzt und danach der Verdau entsprechend der oben genannten Bedingungen durchgeführt.

Die verschiedenen Ansätze wurden in einer SDS-PAGE aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde entsprechend eines Protokolls von Law et al. durchgeführt.⁽¹⁶⁴⁾ Die 15%igen Gele wurden dabei entsprechend Tabelle 3-9 gegossen und die SDS-PAGE mit den Puffern entsprechend Tabelle 3-8 durchgeführt. Die Proben wurden bei 95 °C im

SDS-Probenpuffer für 5 min denaturiert, bevor je 4 µg Protein pro Spur aufgetragen wurden. Die Proteine wurden in der Gelelektrophorese bei konstanter Spannung von 150 mV für 1 h aufgetrennt.

Nach der SDS-PAGE erfolgten drei Waschschr tte in Reinstwasser für je 30 s in der Mikrowelle bei 600 W Leistung, um das SDS auszuwaschen. Anschließend wurde das Gel über Nacht in eine Coomassie-Färbelösung gelegt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen, die für die SDS-PAGE verwendet wurden.

| Lösung | Inhalt |
|-------------------------------------|--|
| <i>Acrylamid-Stammlösung</i> | 30 % Acrylamid |
| <i>Anodenpuffer</i> | 0.2 M Tris*/HCl, pH 8.9 |
| <i>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</i> | 10 % (w/v) APS |
| <i>F rbel sung</i> | Coomassie Brilliant Blue G250 |
| <i>Gel-Puffer</i> | 3 M Tris*/HCl; 0.3 % SDS, pH 8.45 |
| <i>Kathodenpuffer</i> | 0.1 M Tris*; 0.1 M Tricin; 0.1 % SDS |
| <i>Probenpuffer</i> | 0.4 M Tris*/HCl pH 6.8; 20 % (w/v) Glycerin; 8 % SDS; 0.005 (w/v) Bromphenolblau |
| <i>Marker</i> | PageRuler Plus, ThermoScientific 26619 |
| | * <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i> |

Tabelle 3-9: Zusammensetzung der 15%igen Gele für die SDS-PAGE.

| Komponente | Trenngel | Sammelgel |
|--|-----------------|------------------|
| <i>Bisacrylamid</i> | 2000 µL | 265 µL |
| <i>Reinstwasser</i> | 370 µL | 1234 µL |
| <i>Glycerin (99 %)</i> | 300 µL | - |
| <i>Gelpuffer</i> | 1330 µL | 500 µL |
| <i>N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)</i> | 2 µL | 1,6 µL |
| <i>APS</i> | 20 µL | 16 µL |

3.3 Anbindung osteoinduktiver Wachstumsfaktoren

3.3.1 Biotinylierung von BMP-2, BMP-2/6 und Fibronektin

Simulation der Biotinylierung im BMP-2 und BMP-2/6

Die Aminosäuresequenz von BMP-2⁽¹⁶⁵⁾ und BMP-6⁽¹⁶⁶⁾ wurde auf funktionelle Gruppen hin untersucht, die für eine Biotinylierung durch die in Abschnitt 3.1.2 genannten Reagenzien potentiell in Frage kamen. Diese funktionellen Gruppen wurden mit bereits identifizierten wichtigen Strukturabschnitten wie Rezeptorbindestellen verglichen. Mittels der Software *NetSurfP*⁽¹⁶⁷⁾ wurde daraufhin berechnet, ob die entsprechenden funktionellen Gruppen exponiert vorliegen und somit einen Angriff durch das Biotinylierungsreagens deutlich wahrscheinlicher machen. Es wurde darüber hinaus ein Sequenzvergleich von BMP-2 mit BMP-6 mit der Software *LALIGN* durchgeführt,⁽¹⁶⁸⁾ um die möglichen unterschiedlichen Angriffspunkte für das Biotinylierungsreagens darzustellen. Die Proteinstruktur wurde anhand frei verfügbarer Kristallstrukturdaten mit der Software *Chimera* visualisiert.⁽¹⁶⁹⁾

Biotinylierungsreaktion mit Sulfo-NHS-LC-Biotin

Jeweils 10 µg BMP-2 (PHC7145, ThermoScientific, Darmstadt) und BMP-2/6 (7145, BioTechne GmbH, Wiesbaden) wurden in 100 µL Reinstwasser zu einer Konzentration von 3.85 µM gelöst. Sulfo-NHS-LC-Biotin (21335, ThermoScientific, Darmstadt) wurde in Reinstwasser gelöst und in einem molaren Überschuss von 1:2 (Protein:Biotin) zu den Proteinen gegeben. Die Reaktion wurde in einem ThermoMixer (ThermoMixer F2.0, Eppendorf, Hamburg) bei 25 °C, 500 rpm für 1 h durchgeführt. Fibronektin (FC010, Merck Millipore, Darmstadt) wurde in einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ mit einem molaren Überschuss von 1:500 (Protein:Biotin) entsprechend biotinyliert.

Überschüssiges freies Biotin wurde nach der Reaktion durch fünfmalige Zentrifugaldialyse mittels Amicon Ultra Zentrifugenfilter (UFC501024, Merck Millipore, Darmstadt, MWCO 3 kDa) entfernt. Die Dialysate wurden anschließend mit einem HABA-Assay (vgl. Abschnitt 2.2.12) auf freies Biotin hin untersucht. Die Proteinkonzentration der biotinylierten Proteine wurde mit einem BCA-Kit (23225, ThermoScientific, Darmstadt) entsprechend nach dem *enhanced protocol* von Walker et al. anhand einer BSA-Standardreihe bestimmt.⁽¹⁷⁰⁾ Der BCA-Assay beruht auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen durch das

Peptidrückgrat des Proteins. Die einwertigen Kupferionen komplexieren zwei BCA-Moleküle, was in einem photometrisch detektierbaren Farbumschlag der Lösung von grün nach violett (562 nm) resultiert.⁽¹⁷¹⁾

3.3.2 Nachweis und Analyse der Biotinylierung

Kolorimetrischer Nachweis der Biotinylierung mittels Western Blot

Der Erfolg der Biotinylierung wurde qualitativ untersucht, indem das biotinylierte BMP-2 entsprechend Abschnitt 3.2.3 in einer SDS-PAGE zusammen mit dem nicht-biotinylierten BMP-2 aufgetragen wurde. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für eine Detektionsreaktion auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran, Merck Millipore, Darmstadt) geblottet. Dazu wurde das semi-dry-Verfahren angewandt.⁽¹⁷²⁾ Hierbei wurden zwei Filterpapiere mit Transferpuffer vollgesogen und eins mittig auf der Platinanode platziert. Hierauf wurde luftblasenfrei die Membran aufgelegt und mit dem Gel bedeckt. Dieses wurde mit einem weiteren Filterpapier überdeckt, mit der Kathode leicht angedrückt und abgeschlossen. Anschließend wurden die Proteine bei konstanter Stromstärke von 0.8 mA cm⁻² für 90 min auf die Membran übertragen.

Für die Detektionsreaktion wurde die Membran 5 min in Methanol und 5 min in Tris-Pufferlösung (TBS, *Tris-buffered saline*) inkubiert. Anschließend wurde die Membran gegen unspezifische Bindung des Detektionsreagens für 1 h mit 5 % BSA (w/v) in Tris-Pufferlösung mit Tween20 (TBST) geblockt (A1391, AppliChem, Darmstadt). Nach 5 min Waschen in TBST wurde das Detektionsreagens Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Strep-HRP, *Streptavidin Horseradish Peroxidase*) (21130, ThermoScientific, Darmstadt) für 1 h in einer Verdünnung von 1:20000 in einer 1%igen BSA (w/v) in TBST-Puffer angesetzt. Nach jeweils drei Waschschritten von 7 min mit TBST-Puffer und einmal 7 min in TBS-Puffer wurde ein kolorimetrisch aktives Detektionssubstrat (34080, West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, Darmstadt) auf die Membran gegeben. Die Auswertung erfolgte mit einer CCD-Kamera (STELLA 8300, Elysia Raytest GmbH, Straubenhardt) bei 10 s Belichtungsdauer.

Quantifizierung der Biotinmoleküle pro Protein mittels eines HABA-Assays

Es wurde ein Biocytin-Kalibriergerade von 5 – 100 pmol angesetzt. 400 nM Streptavidin-DyLight488 (21832, ThermoScientific, Darmstadt) und 500 µM HABA-Lösung (H5126, Sigma-Aldrich, Darmstadt) wurden für 30 min bei 37 °C und

600 rpm lichtgeschützt als Detektionsreagens angesetzt. Je 10 μL des biotinylierten BMP-2 und der Kalibrierproben wurden in 96-well-Fluoreszenzplatten (Nunc™ F96, 137101, ThermoFischer Scientific, Darmstadt) gegeben und mit je 90 μL Detektionsreagenz versetzt. Im Fluoreszenzreader (Tecan Infinite 200, Theale, UK) wurde bei 485/530 nm Anregungs- und Emissionswellenlänge die vom Streptavidin-Dylight488 freigesetzte Fluoreszenz ermittelt. Der Biotinylierungsgrad wurde aus dem Quotienten der Stoffmenge des eingesetzten Biotins und Proteins berechnet (vgl. Abschnitt 2.2.12).

Bestimmung der Position der Biotingruppe im Protein mit Massenspektrometrie

Um die Position des Biotins im Protein eindeutig zu bestimmen, ist die Auflösung einer SDS-PAGE mit anschließendem Blot und Detektion der biotinylierten Fragmente nicht empfindlich genug. Hierzu muss aminosäuregenau aufgelöst werden. Eine derart empfindliche Auflösung bietet die massenspektrometrische Analyse (MS-Analyse).

Die MS-Analyse wurde zusammen mit der AG Biomedizinische Massenspektrometrie (Institut für Hygiene, Münster) durchgeführt. Das BMP-2 wurde wie in Abschnitt 3.3.1 biotinyliert in einer 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer gelöst. Mit einem Verhältnis von 1:100 (Protease:BMP-2) wurde ein Trypsinverdau (0785, Amresco, Solon, USA) über Nacht durchgeführt und die Verdauprodukte anschließend mittels Vakuumzentrifuge (RVC2-18, Martin Christ GmbH, Osterode am Harz) aufkonzentriert. Die Verdauprodukte wurden in 0.5 % Trifluoressigsäure (TFA, Carl Roth, Karlsruhe) gelagert. Für die MS-Analyse wurden die Proben mit ZipTip-Pipettenspitzen (C18, Millipore, Billerica, USA), Acetonitril und TFA entsprechend der Herstellerangaben entsalzt.

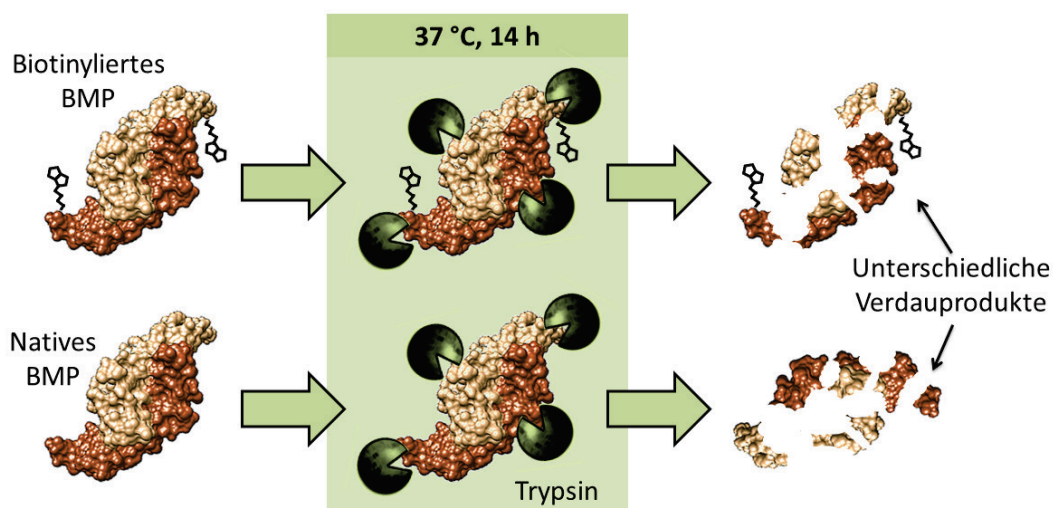


Abb. 3-4: Schema für die Präparation des biotinylierten und nativen BMP-2. Nach einem Verdau mit Trypsin werden Verdauprodukte erhalten, die im biotinylierten Protein ein höheres Molekulargewicht aufweisen müssen.

Die MS-Analyse wurde in einem modifizierten Prototyp (MDS Sciex, Concord, Canada) mit orthogonaler *Time-of-Flight*-Analyse im Reflektormodus durchgeführt. Der Druck im Massenspektrometer betrug dabei 7×10^{-3} mbar N_2 . 0,5 μ L Probe wurde mit 0,5 μ L α -Cyano-4-hydroxymethylsäure-Matrix (CHCA, 10 mg mL⁻¹ in Acetonitril/Wasser (70/30), (v/v)) gemischt, nachdem das System mit rotem Phosphor kalibriert worden war. Die Probe wurde mit einem Laser (337 nm, 200 μ m, 10 – 20 μ J) ionisiert.

Analyse der Sekundärstruktur von biotinyliertem BMP-2

Für die Analyse potentieller Änderungen in der Sekundärstruktur von biotinyliertem BMP-2 wurde die Amid-I-Bande mit FTIR-Spektroskopie untersucht. Ursächlich beruht die Amid-I-Bande zu ca. 90 % auf der C=O-Streckschwingung und zu 10 % auf der N-H-Deformationsschwingung. Diese Schwingungen sind eng an die Konformation des Peptidrückgrats gekoppelt, da in den einzelnen Konformationen unterschiedliche H-Brückenmuster bestehen.⁽¹⁷³⁾ Daher kann die Amid-I-Bande (1700 – 1600 cm⁻¹) als Zusammensetzung und Überlagerung aus verschiedenen Subbanden der einzelnen Sekundärstrukturelemente verstanden werden, die mittels Dekonvolution iterativ angenähert werden können.^{(174)–(176)} Die Position der einzelnen Sekundärstrukturelemente innerhalb der Amid-I-Bande ist bereits für verschiedene Lösungsmittel publiziert (Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: Zuordnung der Sekundärstrukturelemente nach Bandenposition innerhalb der Amid-I-Bande für H₂O. Modifiziert nach Susi et al.⁽¹⁷⁷⁾

| <i>Sekundärstruktur</i> | Bandenposition in Reinstwasser / cm⁻¹ |
|-------------------------|---|
| <i>α-Helix</i> | 1648 – 1657 |
| <i>β-Faltblatt</i> | 1623 – 1641 1674 – 1695 |
| <i>β-turn</i> | 1662 – 1686 |
| <i>Random coil</i> | 1642 – 1652 |

Die Messungen wurden in der AquaSpec-Durchflussmesszelle (Bruker) durchgeführt. 30 µL Proteinlösung mit 0.5 mg mL⁻¹ Proteinkonzentration wurden mit 256 Scans und einer Auflösung von 4 cm⁻¹ und einer Apertur von 6 mm in Reinstwasser aufgenommen. Die Spektren wurden grundlinienkorrigiert (10 Iterationen, 64 Grundlinienpunkte) und vektornormiert. Für die Dekonvolution wurden mithilfe der 2. und 4. Ableitung die Extrempunkte der Subbanden bestimmt. Mit einem Levenberg-Marquardt-Fitting-Algorithmus wurden die einzelnen Subbanden ausgehend von 100 % Lorentz-Gauß-Kurven mit definierter Genauigkeit (RMSD < 10⁻⁴) angepasst. Anschließend wurden die Banden nach Tabelle 3-10 zugeordnet und integriert.

3.3.3 Immobilisierung von bBMP-2 und bBMP-2/6 auf das molekulare Schichtsystem

Berechnung der Brechungsindizes von BMP-2 und BMP-2/6

Der Brechungsindex der beiden Wachstumsfaktoren wurde nach einer Formel von Zhao et al. berechnet.⁽¹⁷⁸⁾ Hierbei wird aus existierenden physikochemischen Daten von jedem Aminosäurerest ein bestimmtes Molekulargewicht M_R, eine spezifische Refraktivität R_R und das jeweilige spezifische Volumen v_R als Grundlage für die Berechnung des Brechungsindex n verwendet (vgl. Tabelle 3-11):

$$n_{BMP2} = \sqrt{\frac{2R_{BMP2} + v_{BMP2}}{v_{BMP2} - R_{BMP2}}} \quad (Gl. 3-1)$$

In die Berechnung der Refraktivität R_{BMP2} fließt die Summe der Refraktivität R_a der einzelnen Reste und des entsprechenden Molekulargewichtes M_a ein:

$$R_{BMP2} = \frac{\sum_a R_a M_a}{\sum_a M_a} \quad (Gl. 3-2)$$

Das spezifische Volumen v_{BMP2} wird aus dem Volumen v_a und dem Molekulargewicht M_a der einzelnen Reste gebildet:

$$v_{BMP2} = \frac{\sum_a v_a M_a}{\sum_a M_a} \quad (Gl. 3-3)$$

Tabelle 3-11: Physikochemische Daten für jeden Aminosäurerest, die als Grundlage für die Berechnung des Brechungsindex verwendet wurden.⁽¹⁷⁸⁾

| <i>Aminosäure</i> | mol. Refraktivität R d. Restes [cm ³] | v [ml g ⁻¹] | M [g mol ⁻¹] |
|-------------------|--|---------------------------|--------------------------|
| <i>Arg</i> | 39,47 | 0,7 | 100,14 |
| <i>His</i> | 34,62 | 0,67 | 81,1 |
| <i>Lys</i> | 34,1 | 0,82 | 72,13 |
| <i>Asp</i> | 26,06 | 0,6 | 59,04 |
| <i>Glu</i> | 30,07 | 0,66 | 73,07 |
| <i>Ser</i> | 19,16 | 0,63 | 31,03 |
| <i>Thr</i> | 23,82 | 0,7 | 45,06 |
| <i>Asn</i> | 26,09 | 0,62 | 58,06 |
| <i>Gln</i> | 30,37 | 0,67 | 72,09 |
| <i>Cys</i> | 48,58 | 0,63 | 47,1 |
| <i>Gly</i> | 12,81 | 0,64 | 1,01 |
| <i>Pro</i> | 23,74 | 0,76 | 42,08 |
| <i>Ala</i> | 17,15 | 0,74 | 15,03 |
| <i>Ile</i> | 31,87 | 0,9 | 57,11 |
| <i>Leu</i> | 31,59 | 0,9 | 57,11 |
| <i>Met</i> | 34,45 | 0,75 | 75,15 |
| <i>Phe</i> | 42,21 | 0,77 | 91,13 |
| <i>Trp</i> | 55,24 | 0,74 | 130,16 |
| <i>Tyr</i> | 44,34 | 0,71 | 107,13 |
| <i>Val</i> | 26,73 | 0,86 | 43,09 |

Immobilisierung biotinylierter Proteine auf das molekulare Schichtsystem

BMP-2 und BMP-2/6 wurden entsprechend Abschnitt 3.3.1 biotinyliert und aufgereinigt; anschließend wurde mittels BCA die Proteinkonzentration bestimmt. Das molekulare Schichtsystem bis Streptavidin wurde wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben auf einer TiO_x-Modelloberfläche aufgebracht. Nach Kalibrierung des SPR-Spektrometers wurde ein SPR-Scan der Oberfläche vor der Applikation von

biotinyliertem BMP-2 erstellt. Biotinyliertes BMP-2 und BMP-2/6 wurden in Konzentrationen von 250 – 500 nM auf der Streptavidinmonolage immobilisiert. Als Kontrolle wurde der nicht-biotinylierte Wachstumsfaktor ebenfalls auf eine Streptavidin-biofunktionalisierte Oberfläche gegeben. Nach 120 min Inkubationszeit wurde mit Lösungsmittel gespült und ein SPR-Scan der Oberfläche aufgenommen.

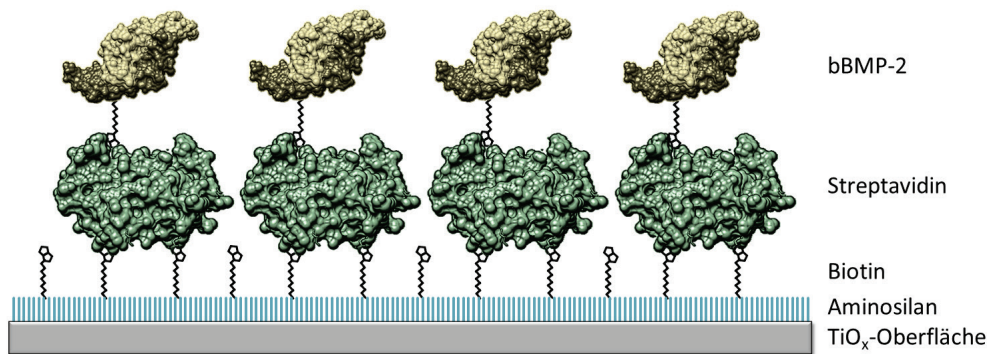


Abb. 3-5: Schema des Schichtsystems mit biotinyliertem BMP-2.

Fibronektin wurde entsprechend Abschnitt 3.3.1 biotinyliert und aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration per BCA bestimmt und das Protein in einer Konzentration von 50 nM in PBS auf der Streptavidin-biofunktionalisierten Oberfläche immobilisiert. Nach 150 min wurde ungebundenes Fibronektin durch Spülen mit PBS entfernt und ein SPR-Scan der Oberfläche aufgenommen.

Die SPR-Scans wurden mit der Software *WinSpall* unter Annahme eines Brechungsindex für BMP von 1.43 und 1.40 für Fibronektin angepasst.⁽¹⁶⁾

Duale Funktionalisierung von TiO_x-Modelloberflächen mit bBMP und biotinyliertem Fibronektin (bFn)

Die duale Biofunktionalisierung einer TiO_x-Modelloberfläche mit dem Wachstumsfaktor bBMP und dem Adhäsionsprotein bFn wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen untersucht (Abb. 3-6):

- A) Ein Multilayerschichtsystem in der Abfolge Streptavidin-bFn-Streptavidin-bBMP
- B) Eine Co-Immobilisation von bFn und bBMP auf einen Streptavidinmonolayer auf TiO_x

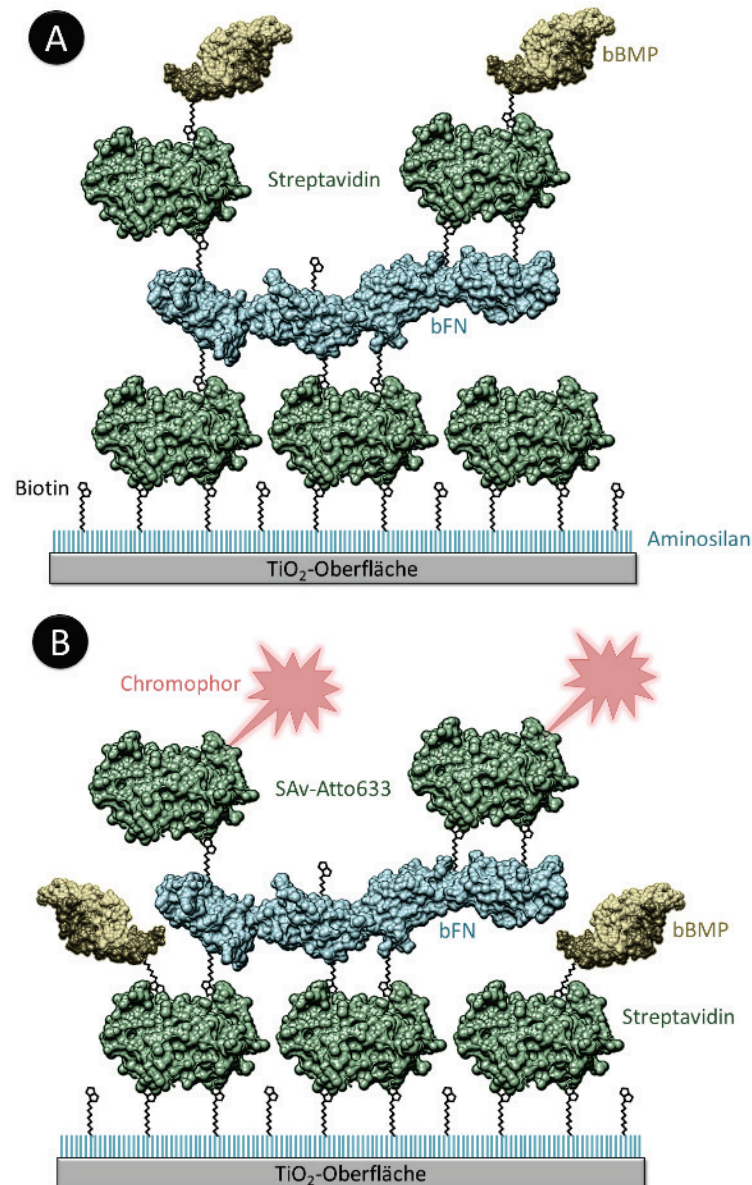


Abb. 3-6: Verschiedene Immobilisationsansätze von bFn und bBMP. A: Aufbau eines alternierenden Multilayers aus Streptavidin, bFn, Streptavidin und bBMP. B: Co-Immobilisierung von bFn und bBMP auf Streptavidin. Die selektive Detektion von bFn mit Streptavidin-Atto633 über die emittierte Fluoreszenz kann zur Berechnung der adsorbierten bFn-Menge verwendet werden.

Bei Methode A kann die Adsorption der Proteine sequentiell mit SPR in einer Echtzeitkinetik verfolgt werden. Dazu wurde eine TiO_x -Modelloberfläche wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben biotinyliert und die Streptavidinarchitektur aufgebracht. Fibronektin wurde wie in Abschnitt 3.3.1 biotinyliert, aufgereinigt und auf eine Konzentration von 50 nM eingestellt. Die Adsorption wurde in einer Echtzeitkinetik verfolgt und nach ca. 60 min gespült, danach wurde ein SPR-Scan aufgenommen. Anschließend wurde in einer weiteren Echtzeitkinetik ein weiteres Streptavidinmonolayer in der gleichen Konzentration aufgebracht. Zuletzt wurde die Adsorption

von biotinyliertem BMP-2 in einer Konzentration von 250 nM in Reinstwasser verfolgt und die entsprechenden SPR-Scans nach jeder Schicht gefittet.

Bei der Co-Immobilisation (Methode B) zweier verschiedener Proteine kann nicht durch ein Fit des SPR-Scans die anteilige Schichtdicke der jeweiligen Proteine diskriminiert werden. Hierzu wurde eine fluoreszenzbasierte Detektion mit SPR kombiniert. Im SPF-Spektrometer ist zusätzlich die Detektion von Fluoreszenz möglich. Dazu wurde Atto633-Streptavidin (AD63361, Attotec, Siegen) verwendet, welches an freie Biotingruppen in dem experimentellen Setup binden und durch den Fluoreszenzdetektor quantifiziert werden kann. Da bei der Co-Immobilisation von bFN und bBMP nur das bFN multibiotinyliert vorliegt, kann Streptavidin-Atto633 auch nur an bFn binden. Somit kann die Menge von bFn im Verhältnis zu bBMP ermittelt werden.

Die Biotinylierung und Aufreinigung beider Proteine geschah wie oben beschrieben. Die Proteine wurden nun in verschiedenen Verhältnissen in PBS-Lösung gebracht (0:250; 50:250; 50:0, in nM) und für 1 h auf einer Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x-Oberfläche immobilisiert. Nach Spülen mit PBS wurde ein SPR-Scan der Oberfläche aufgezeichnet. Streptavidin-Atto633 wurde mit einer Konzentration von 10 µg mL⁻¹ in PBS gelöst und für 45 min auf die biofunktionalisierte Oberfläche gebracht. Bei den Kinetiken wurden die Änderung der Reflektivität und der Fluoreszenz mit einem Oberflächenplasmonen-Fluoreszenz-Resonanz Spektrometer (RT2005, Framersheim) aufgezeichnet. Ebenfalls wurde in den SPR-Scans vor und nach der Messung die Intensität der emittierten Fluoreszenz aufgezeichnet und dazu genutzt, das Verhältnis von bFn:bBMP auf der Oberfläche zu bestimmen.

3.3.4 Effekte von immobilisierten Wachstumsfaktoren auf humane Osteoblasten

Zellkultur humaner Osteoblasten

Humane Osteoblasten (C12720, PromoCell, Heidelberg) wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Corning CLS3290, Sigma-Aldrich, Schnellendorf) in 15 ml RPMI-Medium (Gibco 11875093, ThermoScientific, Darmstadt) ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz passagiert.

Präparation biofunktionalisierter Träger für die Zellkultur

Die Zellkulturuntersuchungen wurden in 6-Well-Platten (Corning CLS3506, Sigma-Aldrich, Schnelldorf) durchgeführt. Es wurden runde BK7-Glasträger (Sonderanfertigung Menzel) mit einer Fläche von 7 cm² 15 min in 2 % Hellmanex-Lösung unter Ultraschall gereinigt und anschließend dreimal in Reinstwasser unter Ultraschall gewaschen. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschriff mit Reinstwasser, bevor die Träger für 5 min in absolutem Ethanol eingelegt und anschließend im Argonstrom getrocknet wurden. Die Träger wurden ohne Goldzwischen-schicht direkt mit TiO_x besputtert. Ein Referenzträger wurde zuvor mit 1.5 nm Chrom und 40 nm Gold besputtert, um eine Schichtdickenbestimmung der TiO_x-Schicht zu ermöglichen. Der Kontaktwinkel der beschichteten Träger wurde an 10 Messpunkten bestimmt. Anschließend wurde das biotinylierte Schichtsystem unter einer Sterilwerkbank aufgebracht. Dazu wurden die TiO_x-Träger zum Desinfizieren zuerst 30 min in absolutem Ethanol inkubiert. Nach einem Lösungsmittelwechsel auf Methanol wurden die Träger 60 min mit 0.5 mM AHAPTMEs beschichtet, anschließend 120 min in ethanolischer 0.5 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung. Danach wurden die Träger dreimal mit sterilem PBS gewaschen, bevor eine sterile 0.75 µM Streptavidinlösung für 60 min zugegeben wurde. Nach einem weiteren Waschschriff in sterilem PBS wurden die biotinylierten Proteine in verschiedenen Kombinationen entsprechend Tabelle 3-12 bei 4 °C über Nacht auf Streptavidin immobilisiert.

Tabelle 3-12: Immobilisationsbedingungen für die verschiedenen Kombinationen von bBMPs und bFn

| Proteine | Konzentration [nM] | Inkubationsdauer [min] |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|
| <i>bBMP-2</i> | 250 | 14 h |
| <i>bFn</i> | 50 | 14 h |
| <i>bBMP-2 + bFn</i> | 250 + 50 | 14 h |
| <i>bBMP-2/6 + bFn</i> | 250 + 50 | 14h |

Die biofunktionalisierten Oberflächen wurden mit sterilem PBS gespült und anschließend in frische 6-Well-Platten überführt.

Bestimmung der Zellfläche auf biofunktionalisierten und nativen TiO_x-Trägern

60.000 Osteoblasten wurden pro Well in RPMI Medium unter Zugabe von 1 % Antibiotikum (Penicillin-Streptomycin, 15140122, ThermoScientific, Darmstadt) auf

den biofunktionalisierten und unbeschichteten TiO_x-Trägern ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Fünf Bilder an verschiedenen Stellen eines jeden Trägers wurden nach 1, 3, 6, 9 und 21 h aufgenommen (BZ-9000, Keyence Bioevo, Neu-Isenburg). Die Zellen wurden gezählt, gemittelt und ihre Zellfläche mit einem spezifischen Keyence-Algorithmus (Cell Separation, Separation Level: 20; Threshold: 234) bestimmt. Die Zellfläche wurde auf die Zellzahl normiert und statistisch mit einem *Student's-t-Test* analysiert.

Detektion osteoblastärer Marker mit PCR

Biofunktionalisierte und native TiO_x-Träger wurden wie oben beschrieben steril präpariert und in 6-Well-Platten gegeben, wo jeweils humane Osteoblasten für Untersuchungen nach 24 h, 48 h und 72 h ausgesät wurden (70.000, 50.000, 40.000). Die Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h lang bei 37 °C, 5 % CO₂ auf den Trägern in RPMI-Medium mit 1 % Antibiotikum kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen dreimal in sterilem HBSS (14025092, ThermoScientific, Darmstadt) gewaschen und wieder abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit einem Lyse-Kit (79656, QIAshredder, Qiagen, Hilden) lysiert und die mRNA entsprechend Herstellerangaben mit einem Kit (74106, RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden) extrahiert. Die Konzentration der extrahierten mRNA wurde mit einem NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer, PeqLab, Erlangen) bestimmt. Die mRNA wurde entsprechend Tabelle 3-13 mit einem Reverse-Transkriptase-Kit (iScript cDNA Synthesis Kit, BioRad Laboratories, München) in cDNA transkribiert (PeqStar 96 universal Thermocycler, PeqLab, Erlangen). Dazu wurde der Gesamtansatz 5 min bei 25 °C aktiviert, anschließend 30 min bei 42 °C transkribiert und dann 5 min bei 85 °C deaktiviert. Die cDNA wurde bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3-13: 20 µL Ansatz für die Transkription der mRNA in cDNA.

| Komponente | Menge [µL] | Hersteller |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|
| <i>mRNA</i> | 1 | BioRad Laboratories |
| <i>iScript Reverse Transkriptase</i> | 1 | BioRad Laboratories |
| <i>iScript Reaction Mix</i> | 4 | BioRad Laboratories |
| <i>Nuklease-freies H₂O</i> | 14 | BioRad Laboratories |

Die erhaltene cDNA wurde bei -18 °C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt aufgetaut, um die osteoblastären Marker Osteocalcin, Osteonektin und Alkalische

Phosphatase zu bestimmen. Die Primer für die Marker wurden mit NCBI Primer BLAST⁽¹⁷⁹⁾ generiert und von Eurofins Genomics synthetisiert (Tabelle 3-15). Dazu wurden unter einer sterilen PCR-Workbench in einer 96-Well-PCR-Platte (HSP9901, BioRad Laboratories, München) der Mastermix für eine quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) entsprechend Tabelle 3-14 pipettiert und mit einer Folie (1814030, BioRad Laboratories, München) verschlossen.

Tabelle 3-14: Mastermix für eine qRT-PCR.

| Komponente | Menge im Ansatz [μL] | Hersteller |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>Sense Primer</i> | 1 | Eurofins Genomics |
| <i>Antisense Primer</i> | 1 | Eurofins Genomics |
| <i>RNase-freies H₂O</i> | 5 | BioRad |
| <i>iSYBR-Mix</i> | 11 | BioRad |
| <i>cDNA</i> | 2 | selbst angesetzt |

Die qRT-PCR wurde in einem Thermocycler (CFX Connect, BioRad Laboratories, München) entsprechend dem Profil in Tabelle 3-16 nach Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur der Primer nach Tabelle 3-15 ausgeführt. Die Daten wurden mit der Software *CFX ManagerTM 2.0* (BioRad Laboratories, München) ausgewertet und auf die Housekeeping-Gene Glycerinaldehyd-3-dehydrogenase (GAPDH) und β -Aktin normiert.

Tabelle 3-15: Verwendete Primer und deren Basensequenz.

| Primer | Sequenz |
|---|-----------------------------|
| <i>Osteocalcin sense</i> | CCT TGG CAG CCC CTC AAG AA |
| <i>Osteocalcin antisense</i> | GGC AGG AAG AGT CGA AGG TC |
| <i>Osteonektin sense</i> | CAG GCG CTA CCT GTA TCA AT |
| <i>Osteonektin antisense</i> | CTG GAG TTT ATT TGG GAG CA |
| <i>Alkalische Phosphatase sense</i> | ACT GCA GAC ATT CTC AAA GC |
| <i>Alkalische Phosphatase antisense</i> | GAG TGA GTG AGT GAG CAA GG |
| <i>GAPDH sense</i> | GGA GCA ATG ATC TTG ATC TT |
| <i>GAPDH antisense</i> | CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT |
| <i>β-Aktin sense</i> | AAA ACC CTG CCA AAT ATG AT |
| <i>β-Aktin antisense</i> | CAG TGA GGG TCT CTC TCT TC |

Tabelle 3-16: Protokoll für die PCR.

| Schritt | Aktivität | Temperatur | Dauer [min:s] |
|---------|--|------------|---------------|
| 1 | Polymerase-Aktivierung | 95 °C | 3:00 |
| 2 | DNA Schmelzen | 95 °C | 0:10 |
| 3 | Primerannealing und Strangverlängerung | 55 °C | 0:30 |
| 4 | 39-fache Wiederholung ab Zyklus 2 | | |

3.4 Simulation einer Schnittstelle zwischen Gingiva und Implantat

3.4.1 Simulation der Biotinylierung von FGF-2 an Aminogruppen

Die Aminosäuresequenz von FGF-2⁽¹⁸⁰⁾ wurde auf funktionelle Gruppen hin untersucht, die für eine Biotinylierung durch die in Abschnitt 3.1.2 genannten Reagenzien potentiell in Frage kommen. Diese funktionellen Gruppen wurden mit bereits identifizierten wichtigen Strukturabschnitten wie Rezeptorbindestellen und der Heparinbindestelle verglichen.⁽¹⁸¹⁾ Mithilfe der Software *NetSurfP*⁽¹⁶⁷⁾ wurde berechnet, ob die entsprechenden funktionellen Gruppen exponiert vorliegen und somit einen Angriff durch das Biotinylierungsreagens deutlich wahrscheinlicher machen. Die Proteinstruktur wurde anhand von frei verfügbaren Kristallstrukturdaten in der PDB Datenbank auf der Basis von 1BLA⁽¹⁸²⁾ mit der Software *USFC Chimera* visualisiert.⁽¹⁶⁹⁾ Ausgehend davon wurden drei Biotinylierungsstrategien mit Sulfo-NHS-LC-Biotin angesetzt:

- I) Biotinylierung eines FGF-Heparin-Komplexes, um die Heparinbindestelle nicht zu beeinträchtigen
- II) Biotinylierung von FGF-2 ohne Heparin
- III) Biotinylierung von Heparin und anschließende elektrostatische Komplexbildung mit FGF-2

3.4.2 Biotinylierung von FGF-2 in Anwesenheit von Heparin

Für den FGF-2-Heparin-Komplex wurden 100 µL FGF-2 (0.1 mg mL⁻¹ in Reinstwasser) mit 10 µL Heparin-Dodecasaccharid (HO12, Iduron Ltd; 2 mg mL⁻¹ in Reinstwasser) versetzt und 30 Minuten im Thermomixer (ThermoMixer F2.0, Eppendorf, Hamburg) bei 25 °C und 500 rpm inkubiert. Anschließend wurde 5 µL Sulfo-NHS-LC-Biotin (21335, ThermoScientific, Darmstadt) zugegeben (4 mg mL⁻¹ in

Reinstwasser, entspricht einem 10-fachen molaren Überschuss) und 1 h Stunde bei 25 °C und 500 rpm inkubiert.

Überschüssiges freies Biotin wurde nach der Reaktion durch fünfmalige Zentrifugaldialyse mittels Amicon Ultra Zentrifugenfilter (UFC501024, Merck Millipore, Darmstadt, MWCO 3 kDa) entfernt. Die Dialysate wurden anschließend auf freies Biotin hin untersucht. Die Proteinkonzentration der biotinylierten Proteine wurde mit einem BCA-Kit (23225, ThermoScientific, Darmstadt) nach dem *enhanced protocol* von Walker et al. anhand einer BSA-Standardreihe bestimmt.⁽¹⁷⁰⁾

Anschließend wurde eine Detektionsreaktion mit Streptavidin-HRP (21130, Strep-HRP, ThermoScientific, Darmstadt) auf einer Membran durchgeführt, um die Biotinylierung über Chemilumineszenz nachzuweisen. Eine Cellophan-Membran (CM-10 Owl Cellophane membrane, ThermoScientific, Darmstadt) wurde 5 min in Methanol und 5 min in TBS-Puffer gewaschen. 3 µL der biotinylierten und nicht-biotinylierten Variante des Moleküls wurden mittig auf die Membran pipettiert und getrocknet. Danach wurde diese für eine Stunde in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) BSA geblockt, anschließend dreimal für 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für eine Stunde mit High Sensitivity Streptavidin-HRP inkubiert (0.005 % (v/v) StrepHRP in TBST-Puffer mit 1 % (w/v) BSA), gefolgt von drei Waschrufen à 7 min, zweimal in TBST-Puffer und einmal in TBS-Puffer. Mithilfe eines Chemolumineszenz-Substrats (SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, 34078, ThermoScientific, Darmstadt) wurde das Detektionsreagenz angesetzt (Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis von 1:1), womit die Membran einige Male benetzt wurde. Zuletzt wurde die Membran mit einer CCD-Kamera für 10 s belichtet und aufgenommen.

3.4.3 Biotinylierung von FGF-2 ohne Heparin

100 µL FGF-2 (0.1 mg mL⁻¹ in Reinstwasser) wurden mit 5 µL Sulfo-NHS-LC-Biotin (4 mg mL⁻¹ in Reinstwasser, entspricht einem 10-fachen molaren Überschuss von Biotin:Protein) versetzt und 1 h Stunde bei 25 °C und 500 rpm inkubiert. Überschüssiges freies Biotin wurde nach der Reaktion durch fünfmalige Zentrifugaldialyse mittels Amicon Ultra Zentrifugenfilter (UFC501024, Merck Millipore, Darmstadt, MWCO 3 kDa) entfernt und die Proteinkonzentration im Anschluss wie oben beschrieben bestimmt. Die Detektion über einen Chemilumineszenz-basierten Streptavidin-HRP-Assay erfolgte wie oben beschrieben.

3.4.4 Biotinylierung von Heparin

Die Biotinylierung von Heparin (H3393, Sigma-Aldrich, Schnellendorf) kann an freien Amingruppen oder an Carboxylgruppen erfolgen. Da für das vorliegende Heparin nicht ohne erheblichen Aufwand nachweisbar war, ob freie Amingruppen vorhanden waren, wurden beide oben genannten Biotinylierungsstrategien durchgeführt.

Für die Biotinylierung an Carboxylgruppen wurden 250 μL einer Heparin-Lösung (2.4 mg mL^{-1} in 0,1 M MES-Puffer; 28390, ThermoScientific, Darmstadt) mit 100 μL einer EDC-Lösung (10 mg mL^{-1} in 0,1 M MES-Puffer; 22981, ThermoScientific, Darmstadt) für 15 min im Thermomixer bei 25 °C und 500 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde mit 42 μL einer β -Mercaptoethanol-Lösung (50 % (v/v) in Reinstwasser; 4227, Carl Roth, Karlsruhe) gestoppt. Überschüssiges EDC wurde in fünf Dialysezyklen gegen Reinstwasser mit Amicon Ultra Zentrifugenfiltern (UFC501024, Merck Millipore, Darmstadt, MWCO 3 kDa) entfernt. Anschließend erfolgte die Biotinylierung mit 1.85 mg Sulfo-NHS-LC-Biotin (10-facher molarer Biotin-Überschuss) und Inkubation für eine Stunde im Thermomixer bei 25 °C und 500 rpm. Für die Biotinylierung an Amingruppen wurden 1 mg Heparin in Reinstwasser und 1.94 mg NHS-PEG₄-Biotin (26137, ThermoScientific, Darmstadt) in Reinstwasser gelöst und eine Stunde bei 25 °C und 500 rpm inkubiert.

Überschüssiges freies Biotin wurde nach der Reaktion durch fünfmalige Zentrifugaldialyse mittels Amicon Ultra Zentrifugenfilter (UFC501024, Merck Millipore, Darmstadt, MWCO 3 kDa) entfernt. Der Nachweis der Biotinylierung erfolgte wie oben beschrieben in einem Chemilumineszenz-basierten Streptavidin-HRP-Assay und zusätzlich durch FTIR-Spektroskopie. Dazu wurden 50 μL des biotinylierten Heparins im Bruker Vertex70 FTIR mit eingesetzter AquaSpec-Messzelle (A741/Q, Bruker, Ettlingen) entsprechend Tabelle 3-17 vermessen. Als Referenz wurde eine Heparinlösung in Reinstwasser mit einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} vermessen.

Die Konzentration von biotinyliertem Heparin nach der Dialyse wurde mit FTIR bestimmt. Dazu wurde eine Standardreihe von Heparin in Reinstwasser angesetzt ($0.0\text{-}2.0 \text{ mg mL}^{-1}$) und davon je 50 μL in der AquaSpec-Messzelle unter den in Tabelle 3-17 genannten Parametern aufgenommen. Jede Kalibrierprobe wurde dreimal angesetzt und vermessen. Anschließend erfolgte in der Software *OPUS* eine Grundlinienkorrektur aller Spektren mit 64 Grundlinienpunkten und 10 Iterationen. Es wurde eine Quant2-Methode in *OPUS* erstellt, die auf Basis einer Integration des Wellenzahlenbereichs von 1315 bis 1080 cm^{-1} der Kalibrierspektren

eine Konzentrationsberechnung einer unbekannten Heparinprobe ermöglicht. Die Genauigkeit der Methode wurde anhand von Proben mit definierter Konzentration getestet.

Tabelle 3-17: Parameter für die Messungen von Heparin in der AquaSpec-Messzelle.

| <i>Parameter</i> | zugewiesener Wert |
|-------------------------------|---|
| <i>Auflösung</i> | 4 cm ⁻¹ |
| <i>Messzeit</i> | 120 Scans |
| <i>Messbereich</i> | 3100 cm ⁻¹ – 1000 cm ⁻¹ |
| <i>Apertur</i> | 6 mm |
| <i>Spiegelgeschwindigkeit</i> | 20 kHz |
| <i>Verstärkung</i> | 1x |
| <i>Phasenauflösung</i> | 32 |
| <i>Phasenkorrektur</i> | Mertz |
| <i>Apodisationsfunktion</i> | Blackman-Harris 3-Term |
| <i>Zerofilling-Faktor</i> | 4 |

3.4.5 Immobilisierung von bFGF-2 auf das molekulare Schichtsystem^a

Der **FGF-2-Heparin-Komplex** wurde entsprechend Abschnitt 3.4.1 biotinyliert und aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration per BCA bestimmt. Das molekulare Schichtsystem bis Streptavidin wurde wie in Abschnitt 3.1.2 auf einer TiO_x-Modelloberfläche aufgebracht (Abb. 3-7). Nach Kalibrierung des SPR-Spektrometers wurde ein SPR-Scan der Oberfläche vor Applikation von biotinyliertem FGF-2 durchgeführt. In einer Echtzeitkinetik wurde aufgezeichnet, wie 250 nM des biotinylierten Wachstumsfaktors auf der Streptavidin-Oberfläche binden. Als Kontrollen wurden der nicht-biotinylierte Wachstumsfaktor und Heparin ebenfalls auf eine Streptavidin-biofunktionalisierte Oberfläche gegeben. Nach ca. 30 min Inkubationszeit wurde mit Lösungsmittel gespült und ein SPR-Scan der Oberfläche aufgenommen.

^a In Zusammenarbeit mit BSc. Alice Belitsky

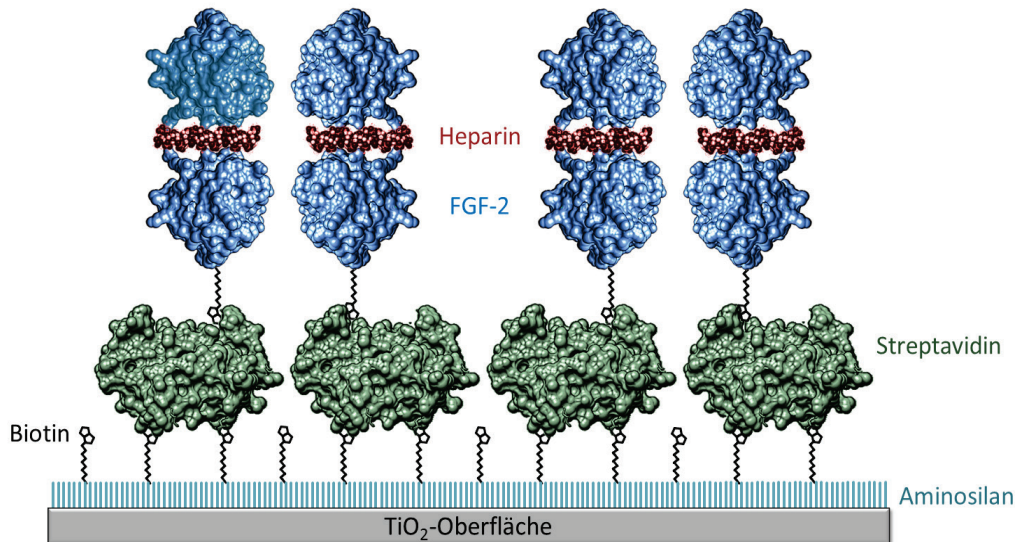


Abb. 3-7: Immobilisierung eines bFGF-2-Heparin-Komplexes auf einer mit Streptavidin biofunktionalisierten TiO_x-Oberfläche.

Auf dieselbe Weise wurde **bFGF-2** in einer Konzentration von 250 bis 500 nM auf das molekulare Schichtsystem immobilisiert (Abb. 3-8).

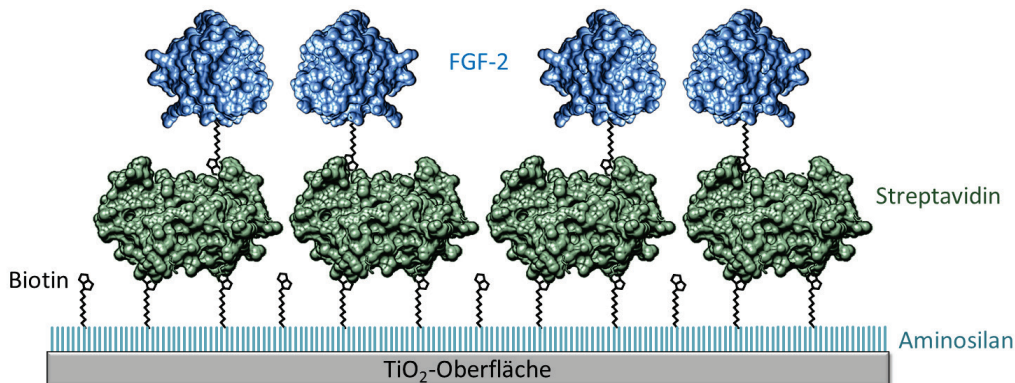


Abb. 3-8: Immobilisierung von bFGF-2 auf einer mit Streptavidin biofunktionalisierten TiO_x-Oberfläche.

Die Immobilisation von 6.66 µM **biotinyliertem Heparin** (bHep) auf das molekulare Schichtsystem wurde für 15 min in Echtzeit verfolgt, anschließend wurde mit Lösungsmittel gespült. Als nächstes wurden 250 bis 500 nM FGF-2 in PBS für 30 min aufgebracht und mit einer Echtzeitmessung im SPR verfolgt. Nach dem Spülen wurde ein SPR-Scan der Oberfläche aufgezeichnet und danach eine Echtzeitkinetik über Nacht, um die Stabilität des Multilayers zu testen. Nach Abschluss der Langzeitkinetik wurde mit PBS gespült und erneut ein SPR-Scan der Oberfläche aufgezeichnet (Abb. 3-9).

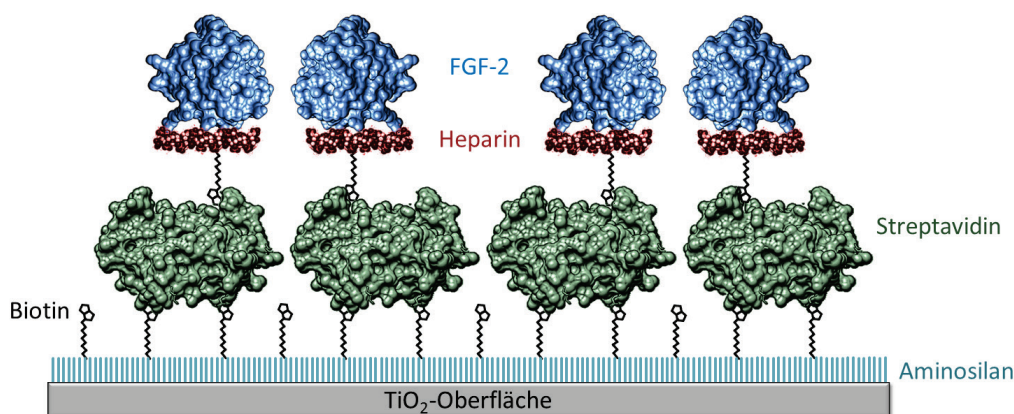


Abb. 3-9: Immobilisierung von biotinyliertem Heparin auf einer mit Streptavidin biofunktionalisierten TiO_x -Oberfläche mit folgender elektrostatischer Immobilisation von FGF-2.

Die SPR-Scans wurden mit der Software *Winspall* unter Annahme eines Brechungsindex von 1.43 für bFGF-2 (vgl. Berechnung nach Zhao et al.⁽¹⁷⁸⁾ im Abschnitt 3.3.3) und 1.64 für Heparin⁽¹⁸³⁾ gefittet.

3.4.6 Effekte von immobilisiertem bFGF-2 auf humane Fibroblasten

Zellkultur humaner pulmonarer Fibroblasten und MG-63-Osteoblasten

Humane Fibroblasten und MG-63-Osteoblasten wurden freundlicherweise vom Institut für medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien wurden in Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (12491, Gibco) mit 4 mM L-Glutamin (25030, Gibco), 10 % FCS (10500, Gibco) und 1 % Antibiotikum (PenStrep, 15070, Gibco) bei 37 °V, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz passagiert, indem mit 3 ml Trypsin-EDTA (250200, Gibco) die Zellen von der Oberfläche gelöst und anschließend für 5 min bei 1600 min^{-1} zentrifugiert wurden. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 mL Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro 75 cm^2 -Zellkulturflasche wurden 5×10^5 Zellen ausgesät. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage ausgetauscht.

Präparation biofunktionalisierter Oberflächen

Die Zellkulturuntersuchungen wurden in 6-Well-Platten (Corning CLS3506, Sigma-Aldrich, Schnellendorf) durchgeführt. Es wurden runde BK7-Glasträger (Sonderanfertigung Menzel) mit einer Fläche von 7 cm^2 15 min in 2 % Hellmanex-Lösung unter Ultraschall gereinigt und anschließend dreimal in Reinstwasser unter

Ultraschall gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Reinstwasser wurden die Träger für 5 min in absolutem Ethanol eingelegt und anschließend im Argonstrom getrocknet. Die Träger wurden ohne Goldzwischen-schicht direkt mit TiO_x besputtert. Ein Referenzträger wurde zuvor mit 1.5 nm Chrom und 40 nm Gold besputtert, um eine Schichtdickenbestimmung der TiO_x -Schicht zu ermöglichen. Verschiedene Biofunktionalisierungen wurden unter einer Sterilwerkbank aufgebracht. Dazu wurden die TiO_x -Träger zur Desinfektion zuerst für 30 min in absolutem Ethanol inkubiert. Nach einem Lösungsmittelwechsel auf Methanol wurden die Träger 60 min in 0.5 mM AHAPTMEs-Lösung inkubiert, anschließend für 120 min in ethanolischer 0.5 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung. Danach wurden die Träger dreimal mit sterilem PBS gewaschen, bevor eine sterile 0.5 μM Streptavidinlösung über Nacht aufgebracht wurde. Nach einem weiteren Waschschrift in sterilem PBS wurden die biotinylierten Proteine in verschiedenen Kombinationen entsprechend Abb. 3-10 und Abb. 3-11 für 2 h auf Streptavidin immobilisiert. Die Lösungen wurden abgesaugt und in jedes Well 10^5 Zellen in 2 ml Medium ausgesät.

Als Vergleichsgruppen wurde bFGF-2 auf Streptavidin, bHep mit FGF-2 auf Streptavidin und bBMP-2 auf Streptavidin verglichen. Als Positivkontrolle wurde bei den Fibroblasten ein TiO_x -Träger mit 4 μg FGF-2 im Medium, bei den Osteoblasten mit der entsprechenden Menge BMP-2 im Medium ausgesät. (Die gelöste Menge entsprach der immobilisierten Menge auf den biofunktionalisierten Trägern.) Als Negativkontrolle dienten ein TiO_x -Träger ohne Beschichtung und ein TiO_x -Träger mit Streptavidinbeschichtung.

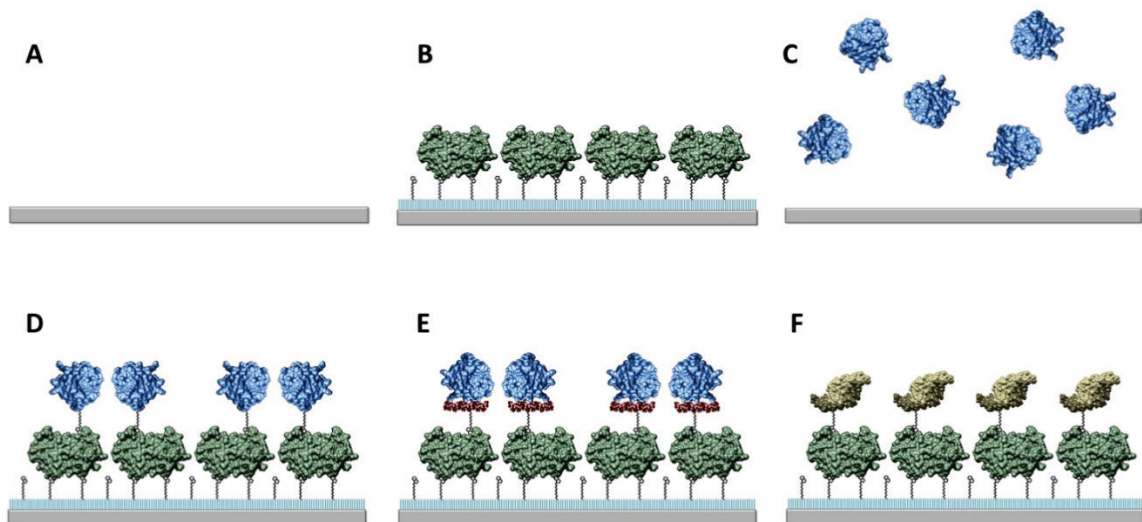


Abb. 3-10: Verschiedene Biofunktionalisierungsansätze, auf denen das Wachstum von humanen pulmonaren Fibroblasten getestet wurde. A: TiO_x , B: bTiO_x -Streptavidin, C: TiO_x + sFGF-2, D: bTiO_x -SAv-bFGF-2, E: bTiO_x -SAv-bHep + FGF-2, F: bTiO_x -SAv-bBMP-2

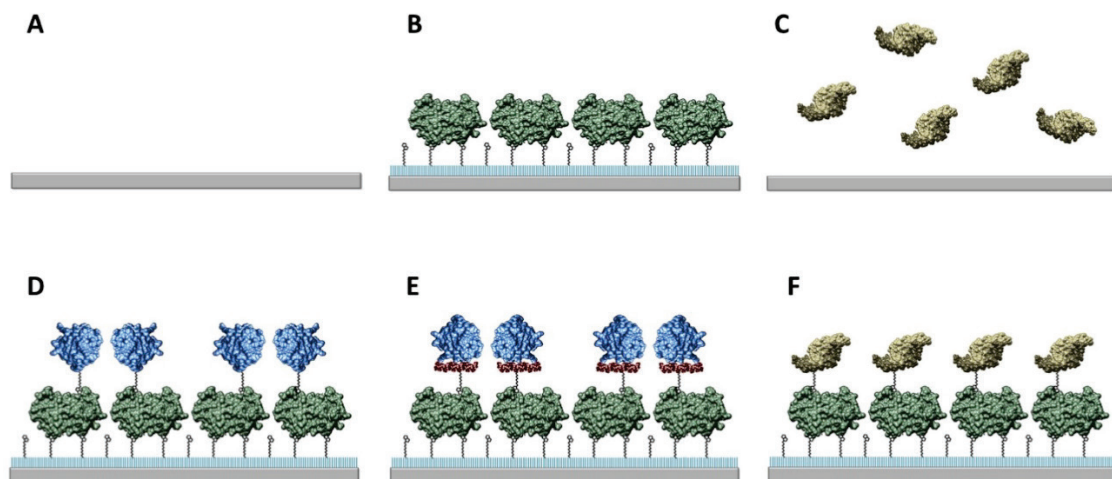


Abb. 3-11: Verschiedene Biofunktionalisierungsansätze, auf denen das Wachstum von humanen Osteoblasten (MG-63) getestet wurde. A: TiO_x , B: bTiO_x -Streptavidin, C: TiO_x + sBMP-2, D: bTiO_x -SAv-bFGF-2, E: bTiO_x -SAv-bHep + FGF-2, F: bTiO_x -SAv-bBMP-2

Bestimmung der Zellfläche und der Proliferation

Das Zellwachstum wurde mikroskopisch nach 1, 8, 13, 19 und 24 h verfolgt. Nach 24 h wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in einer 96-Well-Fluoreszenzplatte (Nunc) mit 2×10^4 Zellen in 100 μL ausgesät. Entsprechend den Herstellerangaben wurden 20 μL Reagenz eines Proliferationsassays (G8080, CellTiter-Blue®, Promega, Mannheim) hinzu pipettiert. Nach 4 h Inkubation bei 37 % und 5 % CO_2 wurde die Fluoreszenz in einem Microreader (Infinite M200, Tecan) bei 560/590 nm Exzitation/Emission bestimmt.

3.5 Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat-Modelloberflächen^a

3.5.1 Charakterisierung ultradünner Calciumphosphat-Modelloberflächen

Rf-Magnetron-Sputtering

Für die Modelloberflächen wurden hochbrechende $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ LaSFN9-Glasträger (Resonant Technologies, Framersheim) oder Siliziumwafer (WSI04-1002001, Active Business Company) 20 min in 2 % Hellmanex-III-Lösung (Hellma Analytics, Müllheim) unter Ultraschall gereinigt, anschließend dreimal je 8 min in Reinstwasser ins Ultraschallbad gelegt und danach 10 min in absolutem Ethanol (Merck Millipore, Darmstadt) inkubiert. Die nachfolgende Trocknung geschah im Argonstrom, anschließend wurden die Träger unter Schutzgas gelagert. Zuerst wurde eine 1.5 nm Chromschicht als Haftvermittler aufgebracht, bevor eine 50 nm Goldschicht aufgedampft wurde (Edwards FL Auto 306, München). Die anschließend aufgesputterte (300 W , 0.05 nm sec^{-1}) HAp-Schicht (Edwards Auto 500, München) sollte nach Einstellung 5, 10 und 20 nm betragen. Beim RF-Magnetronspattern von HAp entsteht kein stöchiometrisches Hydroxylapatit, sondern eine amorphe Form, die im Folgenden mit CaP bezeichnet wird. Sämtliche Sputterprozesse wurden vom MPIP Mainz durchgeführt.

Die Schichtdickenmessung erfolgte mit SPR, Ellipsometrie, Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM).

Charakterisierung

SPR

Die Schichtdickenmessung mit SPR wurde wie in Abschnitt 3.1 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der Löslichkeit der gesputterten Schichten wurde die Schicht nur gegen Luft vermessen. Der Brechungsindex für CaP wird mit 1.66 angegeben, was einer Dielektrizitätskonstante ϵ_r von 2.77 entspricht.⁽¹⁵⁹⁾ Ultradünne keramische Schichten absorbieren nahezu kein Licht, für den Imaginärteil ϵ_i der Dielektrizitätskonstante erhält man 0.025. Der Fit der Schichtdicke erfolgte im Programm *Winspall* unter Verwendung der oben genannten Dielektrizitätskonstante.

^a In Zusammenarbeit mit BSc. Daniel Sieme und BSc. Stefan Leushacke

Ellipsometrie

Für die Schichtdickenmessung mit Ellipsometrie musste das Nullellipsometer (AutoEL-II, Rudolph Research, Flanders, USA) zuerst kalibriert werden. Dazu wurde eine Kalibrierprobe verwendet, bei der die Dicke der Oxidschicht sowie der Brechungsindex genau bekannt ist (A9291, Rudolph Research, Flanders, USA). Bei der verwendeten Kalibrierprobe betrug die Dicke der Oxidschicht $1185 \pm 3 \text{ \AA}$, der Brechungsindex n_s des Substrats 3.882 und die Absorptionskonstante k_s 0.019. Die Kalibrierung geschah entsprechend den Herstellerangaben. Nach der Kalibration wurden auf einem mit CaP besputterter Wafer 10 Messpunkte auf der Oberfläche mit dem internen Messprogramm 1 vermessen. Die erhaltenen Werte für Ψ und Δ wurden in der Software *DAFIBM87* in ein double-layer Modell eingegeben (Tabelle 3-18).

Tabelle 3-18: Parameter für die Auswertung der Messungen von CaP auf Si-Wafern.⁽¹⁵⁹⁾

| <i>Schicht</i> | Brechungsindex n | Absorptionskonstante k | Schichtdicke L [Å] |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <i>Luft</i> | 1.000 | 0 | ∞ |
| <i>CaP</i> | 1.66 | 0.025 | L_{CaP} |
| <i>Oxidschicht</i> | 1.450 | 0 | 19 |
| <i>Substrat</i> | 3.882 | 0.019 | ∞ |

AFM

Für die Rasterkraftmessungen wurde ein *Innova AFM* (Bruker, Ettlingen) eingesetzt, die Steuerung erfolgte über das Programm *SPM-Lab*. Für die Visualisierung von Strukturen in der Größenordnung weniger Nanometer ist es entscheidend, dass die Substratoberfläche atomar eben vorliegt. Daher wurden nur mit CaP besputterte (1 0 0) Si-Wafer (WSI04-1002001, Active Business Company) verwendet. Die verwendeten Spitzen (RFESPA, MPP-21120-10, Bruker, Ettlingen) wurden in den Spitzenhalter eingesetzt und je nach zu untersuchender Größenordnung wurde der large-area-Scanner oder small-Area-Scanner eingebaut. Die Resonanzfrequenz des Cantilevers wurde ermittelt und so eingestellt, dass der Setpoint 2 V betrug. Die Einstellung der Gain-Parameter erfolgte für jede Oberfläche neu, indem die Parameter des PID-Reglers so eingestellt wurden, dass das Forward-und Backward-Signal bestmöglich übereinstimmten.

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software *SPMLabAnalysis V7.0*. (Bruker, Ettlingen).

Rasterelektronenmikroskopie

LaSFN9-Träger wurden wie oben beschrieben mit 1.5 nm Chrom, 50 nm Gold und ca. 20 nm CaP besputtert. Da keramische Schichten zur Aufladung neigen, wurde für die Charakterisierung im REM eine dünne Gold-Palladium-Schicht (Au:Pd = 80:20, 2 – 15 nm) aufgebracht, um die Probe leitfähig zu machen. Anschließend wurde einer der Träger in flüssigen Stickstoff eingetaucht und dort zerbrochen. Die Bruchkante wurde dann mit einem ESEM Quanta 400 FEG (FEI) im Hochvakuum von Dr. K. Loza untersucht und die Schichtdicke bestimmt.

FT-IRRAS

Die FTIR-Spektren wurden wie in Abschnitt 3.1.1 mit einer 80° Reflektionseinheit unter streifendem Einfall (*A518*, Bruker, Ettlingen) aufgenommen. Als Referenz wurde ein mit 1.5 nm Chrom und 50 nm Gold bedampfter Glasträger verwendet. Die Probenkammer wurde geschlossen und mindestens 30 min mit N₂ begast, um atmosphärisches Wasser und CO₂ zu entfernen. Die Spektren der Proben wurden unter den in Tabelle 3-19 genannten Parametern aufgenommen.

Tabelle 3-19: Parameter für die FT-IRRAS Messungen mit der Reflektionseinheit A518.

| <i>Parameter</i> | <i>zugewiesener Wert</i> |
|-------------------------------|--|
| <i>Auflösung</i> | 4 cm ⁻¹ |
| <i>Messzeit</i> | 220 Scans |
| <i>Messbereich</i> | 4000 cm ⁻¹ – 850 cm ⁻¹ |
| <i>Apertur</i> | 6 mm |
| <i>Spiegelgeschwindigkeit</i> | 20 kHz |
| <i>Phasenauflösung</i> | 32 |
| <i>Phasenkorrektur</i> | Mertz |
| <i>Apodisationsfunktion</i> | Blackman-Harris 3-Term |
| <i>Zerofilling-Faktor</i> | 4 |

Sofern möglich, wurden drei Spektren aufgenommen und ein Mittelwertspektrum erstellt.

Nach Aufnahme der Spektren wurden diese analysiert, indem eine Grundlinienkorrektur mit der zugehörigen Software *OPUS* (Bruker, Ettlingen) mithilfe der

konkaven Gummibandmethode in mindestens 10 Iterationen bei 64 Grundlinienpunkten durchgeführt wurde. Zudem wurde eine in der Software implementierte atmosphärische Korrektur durchgeführt, bei der mögliche störende Hintergrundsignale durch Reste von CO₂ oder Wasserdampf eliminiert wurden.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

1.5 x 1.5 cm² Si-Wafer wurden wie oben beschrieben aufgereinigt, mit 50 nm Gold bedampft und anschließend mit 20 nm CaP besputtert. Zur Untersuchung der elektronischen Bindungsvorgänge an der CaP-Oberfläche wurde der Wafer mit 0.5 mM AHAPTMEs-Lösung in Methanol beschichtet und anschließend dreimal mit absolutem Methanol gespült. Nach Trocknung im Stickstoffstrom wurden die Wafer in Schutzgas verpackt und am Synchrotron BESSY II des Helmholtzzentrums Berlin (HE-SGM Strahlrohr) vermessen.^a Es wurde ein Übersichtsspektrum im Bereich von 0 – 600 eV mit einer Einfallenergie von 700 eV aufgenommen. Die Energiekalibrierung wurde anhand des Übersichtsspektrum, indem das C1s-Signal auf 285 eV gesetzt wurde.

Tabelle 3-20: Mess- und Auswertungsparameter bei den XPS-Messungen.

| <i>Spektrum</i> | Einfallenergie [eV] | Untergrundkorrektur |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>O1s</i> | 650 | O1s Shirley-Untergrund |
| <i>Si2p</i> | 350 | Linearer Untergrund |
| <i>P2p</i> | 350 | Linearer Untergrund |

Für die Fits wurde der *least squares-Algorithmus*, für die Peakform *Gauß* gewählt. Die Breite der angepassten Gauß-Glockenkurven wurde so gewählt, dass in einem Spektrum alle Peaks die gleich breit waren.

3.5.2 Stabilität ultradünner Calciumphosphat-Schichten in verschiedenen Lösungsmitteln

Gesputterte HAp-Schichten sind stöchiometrisch kein reines HAp. Die entstehende CaP-Phase ist amorph. Daher ist ihre Löslichkeit niedriger als die von stöchiometrischem HAp. Dieses Phänomen und die damit verbundene höhere Löslichkeit gesputterter Schichten sind in der Literatur beschrieben.⁽¹⁴³⁾

^a Messungen wurden von Prof. Dr. Eva Kovacevic, GREMI, Université d'Orléans, durchgeführt.

Um dieses Problem bei gesputterten CaP-Modellschichten zu lösen, wurde die Löslichkeit dieser Schichten in verschiedenen wässrigen und organischen Lösungsmitteln untersucht. Es ist bekannt, dass die Löslichkeit von CaP größer wird, wenn der pH-Wert sinkt.⁽¹⁰⁵⁾ Zudem kann die Löslichkeit von CaP durch Zugabe von Ca^{2+} - oder PO_4^{3-} -haltigen Salzen in das Lösungsmittel gesenkt werden. In organischen Lösungsmitteln ist die Löslichkeit anorganischer Materialien prinzipiell stark herabgesetzt oder auch gar nicht vorhanden.

1.5 x 1.5 cm²-LaSFN9-Träger und Si-Wafer wurden wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben präpariert und für 1 h in die in Tabelle 3-21 gelisteten Lösungsmittel eingelegt.

Tabelle 3-21: Verschiedene Lösungsmittel und Gemische zum Test der Löslichkeit von CaP.

| <i>Lösungsmittel</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|-------------------------------------|
| <i>1x PBS, pH 7.4</i> | VRW, E404-200TABS |
| <i>Na₂HPO₄, pH 10.0</i> | AppliChem, A1046 |
| <i>Simulated Body Fluid (SBF)</i> | Nach Kokuba et al. ⁽¹²⁸⁾ |
| <i>Ethanol</i> | Merck Millipore |
| <i>Dimethylsulfoxid (DMSO)</i> | D8418, Sigma-Aldrich |
| <i>DMSO:PBS (50:50)-(10:90)(v/v)</i> | Selbst angesetzt |

Die nachfolgende Schichtdickenbestimmung geschah entsprechend der in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Prozedur mit SPR und Ellipsometrie. Mit IRRAS konnte qualitativ CaP auf der Oberfläche detektiert werden. Bei einem Teil der Proben wurde zusätzlich mit AFM die Oberflächentopographie vor und nach der Inkubation mit Lösungsmittel visualisiert.

3.5.3 Adsorption von Streptavidin auf TiO_x in verschiedenen Lösungsmitteln

Eine weitere Anforderung muss das Lösungsmittel erfüllen, um die Übertragung des molekularen Schichtsystems auf CaP zu ermöglichen: Es darf die Interaktion von Biotin-Streptavidin nicht beeinträchtigen. Um die in Abschnitt 3.5.2 getesteten Lösungsmittel auf diese Eigenschaft hin zu untersuchen, wurde als Referenzoberfläche eine biotinylierte TiO_x-Modelloberfläche verwendet. Diese wurde entsprechend Abschnitt 3.1.2 bis zum Streptavidin beschichtet. Die Adsorption von Streptavidin wurde dann für alle relevanten Lösungsmittel unter gleichen Bedingungen im SPR getestet (750 nM, 45 min). Ein SPR-Scan der Oberfläche vor und nach der

Adsorption von Streptavidin wurde mit der Software *Winspill* auf Basis der Fresnel'schen Gleichungen gefittet. Für die Fits mit den verschiedenen Lösungsmitteln wurden die in Tabelle 3-22 angegebenen Dielektrizitätskonstanten verwendet.

Tabelle 3-22: Dielektrizitätskonstanten für verschiedene Lösungsmittel,⁽¹⁵⁹⁾ auf deren Basis das molekulare Schichtsystem in der Software Winspill gefittet wurde.

| <i>Lösungsmittel</i> | ϵ_r | ϵ_i |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>1x PBS</i> | 1.79 | 0 |
| <i>Ethanol</i> | 1.85 | 0 |
| <i>DMSO</i> | 2.17 | 0 |
| <i>Na₂HPO₄, pH 10.0</i> | 1.79 | 0 |

Für die verschiedenen Mischungsverhältnisse von DMSO-PBS existieren in der Literatur keine Werte für den Brechungsindex, daher wurden diese mit SPR bestimmt. Dazu wurde ein unbeschichteter LaSFN9-Träger in die Messzelle eingebaut, mit dem Lösungsmittelgemisch befüllt und ein SPR-Scan aufgenommen. Dies geschah für die DMSO:PBS Verhältnisse (v/v) 100:0; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90 und 0:100. Die SPR-Scans wurden anschließend mit der Software *Winspill* gefittet.

3.5.4 Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat

Die Übertragung des molekularen Schichtsystems auf CaP wurde entsprechend dem Aufbau des Schichtsystems auf TiO_x-Modellschichten durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.1.2). Dabei wurde die CaP-Oberfläche zunächst für 60 min mit einer 0.5 mM methanolischen AHAPTMEs-Lösung, anschließend für 120 min mit Sulfo-NHS-LC-Biotin in Ethanol/Wasser (90:10, v/v) inkubiert. Nach einem Lösungsmittelwechsel auf DMSO:PBS (30:70, v/v) wurde eine 750 nM Streptavidinlösung in dem gleichen Lösungsmittelgemisch für 45 min zugegeben. Dies wurde in einer Echtzeitkinetik im SPR verfolgt. Nach dem Adsorptionsprozess wurde gespült und ein SPR-Scan aufgezeichnet. Zum Vergleich wurde der Beschichtungsprozess mit einer 5 mM AHAPTMEs-Lösung und anschließendem Aufbau der weiteren Moleküllagen des Schichtsystems durchgeführt. Als Kontrolle wurde die unspezifische Adsorption von Streptavidin auf CaP gemessen. Die Schichtdicke wurde mit der Software *Winspill* unter der Annahme einer ϵ_r von 1.91 gefittet. Der Träger wurde anschließend im FTIR gegen eine unbeschichtete Goldreferenz vermessen. Vor der Messung wurde

der Träger dreimal mit DMSO und einmal mit Ethanol gespült und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Die Messung wurde gemäß der in Abschnitt 3.5.1 genannten Parameter durchgeführt.

Der gleiche Ansatz wurde auf CaP-besputterten $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ -Si-Wafern durchgeführt. Diese wurden mittels Ellipsometrie wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben nach den verschiedenen Inkubationsschritten vermessen.

Darüber hinaus erfolgte ein weiterer qualitativer Nachweis der spezifischen Bindung von Streptavidin an das molekulare Schichtsystem auf CaP auf kolorimetrischer Basis. Dazu wurde auf einem CaP-besputterten $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ Glasträger (BK7, Menzel, Braunschweig) das molekulare Schichtsystem teilweise bis Biotin aufgebracht. Dies geschah, indem der Träger nur zur Hälfte in die AHAPTMES-Lösung (0.5 mM, im Vergleichsversuch 5 mM) eingetaucht wurde. Anschließend wurde der Träger um 90° gedreht und wieder zur Hälfte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin beschichtet (vgl. Abb. 3-12). Für die Streptavidinadsorption über die komplette Trägerfläche wurde nun ein Streptavidin verwendet, an welches eine Meerrettichperoxidase konjugiert war (21130, Strep-HRP, ThermoScientific, Darmstadt). Diese oxidiert in Anwesenheit von Peroxiden ein auf Luminol basierendes Substrat (SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, 34078, ThermoScientific, Darmstadt), was als Chemolumineszenz detektiert werden kann. Die Strep-HRP-Adsorption wurde nach 45 min (750 nM) gestoppt und der Träger vorsichtig gespült. Anschließend wurde der Träger mit einer CCD-Kamera (STELLA 8300, Elysia Raytest GmbH, Straubenhardt) 10 s bis 120 s lang belichtet und die verschiedenen Bereiche auf ihre Intensität der Schwärzung hin analysiert.

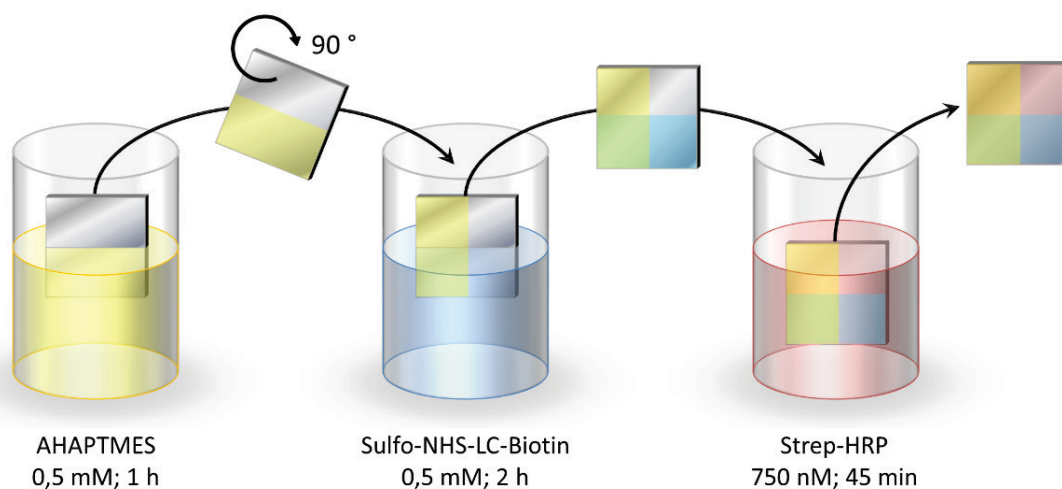


Abb. 3-12: Partielle Beschichtung der Träger mit AHAPTMES, Sulfo-NHS-LC-Biotin und Streptavidin-HRP.

Die unterschiedlich beschichteten Bereiche auf den Glaträgern wurden einer weiteren Auswertung mit FT-IRRAS unterzogen. Hierzu wurden die verschiedenen Bereiche nach der Detektionsreaktion mit den in Abschnitt 3.5.1 genannten Parametern mit kleiner Lochblende (0.7 cm) vermessen. Die Auswertung der Spektren wurde mit der Software *OPUS* durchgeführt, indem nach einer Grundlinienkorrektur bei 64 Grundlinienpunkten und 10 bis 20 Iterationen die Amid-I-Bande von 1710 bis 1580 cm⁻¹ integriert wurde. Die daraus erhaltenen Verhältnisse wurden für die Beurteilung eines semiquantitativen Unterschieds zwischen spezifisch und unspezifisch adsorbierten Streptavidin herangezogen.

3.5.5 Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat mit einer Silikat-Schicht

Stöber-Synthese mit verschiedenen Ammoniaküberschüssen

Über eine Sol-Gel-Reaktion nach dem Stöber-Prozess kann aus einem Alkoxysilan kinetisch kontrolliert nanoskalige Silikat-Partikel oder eine ultradünne Silikat-Schicht aufgebaut werden.⁽¹⁸⁴⁾ Dieser Prozess wurde genutzt, um die gesputterte CaP-Oberfläche mit einer Schicht zu überdecken, an die kovalent die weiteren Komponenten des Schichtsystems gebunden werden können.

Der Stöber-Prozess wurde für 16 h in 40 ml Ethanol, 26 µL NH₃ (EMPLURA® 32 %, 105426, MerckMillipore, Darmstadt) und 50 µL Tetraethylorthosilikat (TEOS, 8006581000, MerckMillipore, Darmstadt) auf unbeschichteten Si-Wafern durchgeführt, die zuvor für 15 min in 2 % Hellmanex-Lösung mit Ultraschall aufgereinigt wurden. Nach dem Prozess wurde der Si-Wafer dreimal mit absolutem Ethanol gespült und die Schichtdicke entsprechend Abschnitt 3.1.2 mit Ellipsometrie bestimmt. Der Stöber-Prozess wurde durch verschiedene Variationen der Dauer (1 – 16 h) und Variationen der NH₃-Konzentration im Reaktionsansatz (0.05 – 5 % v/v) modifiziert und die Schichtdicke mit Ellipsometrie, SPR und AFM vermessen.

Adsorption des Schichtsystems auf Calciumphosphat-Silikat

CaP-gesputterte 1.5 x 1.5 cm² Si-Wafer / LaSFN9-Träger wurden wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben hergestellt und für 8 – 16 h in eine Lösung aus 40 ml Ethanol, 2.6 ml NH₃ und 50 µL TEOS gestellt. Nach der Inkubation wurde der Si-Wafer dreimal mit absolutem Ethanol gespült und die Schichtdicke vermessen. Anschließend wurde der Träger gemäß Abschnitt 3.5.4 für 60 min mit AHAPTMS

(0.5 mM / 5 mM), 120 min mit 0.5 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin und danach mit 750 nM Streptavidin inkubiert. Die Schichten wurden mit Ellipsometrie und mit IRRAS vermessen.

Unterschiede der adsorbierten Streptavidinmenge wurden semiquantitativ mit IRRAS bestimmt, indem eine Quantifizierungsmethode durch Integration der Amid-I-Region ($1710\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$) erstellt wurde. Die Spektren wurden dazu durch eine Grundlinienkorrektur mit 64 Grundlinienpunkten und 20 Iterationen normiert. Die Methode wurde anhand einer Standardreihe definierter Streptavidinmengen (0 – 25 μg) in einem Volumen von 10 μL kalibriert.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Charakterisierung und Biofunktionalisierung von TiO_x-Modell- oberflächen

4.1.1 Charakterisierung von TiO_x-Modelloberflächen

Das Sputtern von TiO_x-Modellschichten auf LaSFN9/BK7-Trägern ergab eine Schichtdicke von 5.0 ± 1.5 nm nach Fit der SPR-Scans in der Software *Winspall*. Der Kontaktwinkel betrug je nach Charge und Messzeitpunkt zwischen 50 bis 78°. Eine Messung des Kontaktwinkels kurz nach dem Sputterprozess ergab $49.6 \pm 2.1^\circ$, eine Messung nach 4 Wochen $78.6 \pm 1.9^\circ$. Der Einfluss der Lagerungsdauer im Exsikkator auf den Kontaktwinkel ist in Abb. 4-1 dargestellt. Der Kontaktwinkel steigt mit längerer Lagerungsdauer an. Er korreliert mit der Anzahl der OH-Gruppen auf der Oberfläche.

Das UV-VIS-Spektrum zeigte eine Absorptionsbande bei 320 nm, gemessen gegen eine unbeschichtete BK7-Referenz. Die Bande bei 320 nm ist indikativ für die Anregung von Elektronen in TiO₂.⁽¹⁸⁵⁾ Auch eine Bestimmung des Brechungsindex auf TiO_x-gesputterten Si-Wafern mit Ellipsometrie ergab einen Brechungsindex von 2.32, übereinstimmend mit optischen Daten für die Rutil-Phase von TiO₂.⁽¹⁵⁹⁾ Die Modellschicht liefert nach gängigen Charakterisierungsmethoden vergleichbare Werte von TiO₂-Bulk-Material.⁽¹⁸⁶⁾ Die Adsorptionsprozesse, die an der Grenzfläche einer solchen Modellschicht ablaufen, sind also mit denen auf größeren Werkstücken aus Titan vergleichbar, denn Titan bildet an der Luft eine Titanoxidschicht. Folglich sind die ultradünnen TiO_x-Modellschichten zur Untersuchung molekularer Biofunktionalisierungsverfahren von Titanimplantaten geeignet.

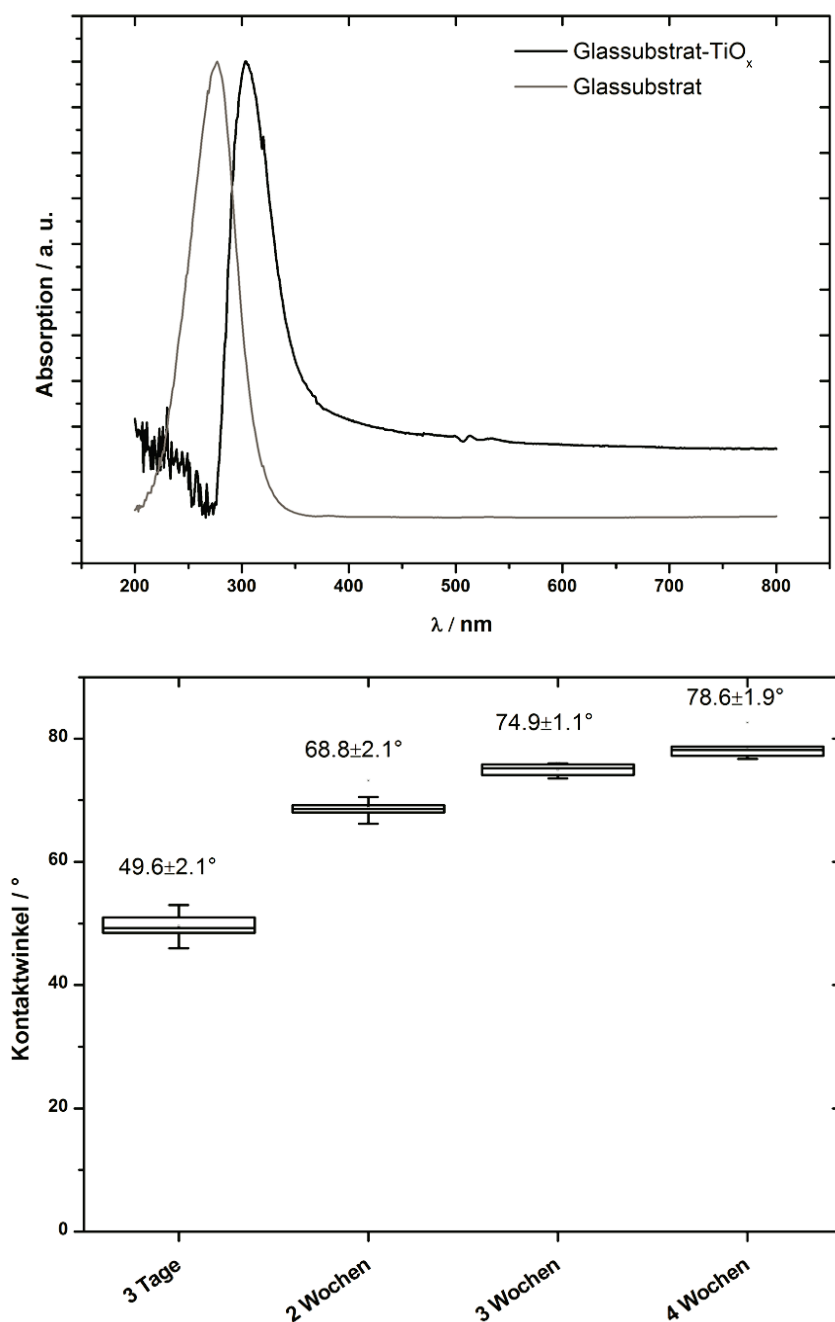


Abb. 4-1: Einfluss der Lagerungsdauer auf den Kontaktwinkel gesputterter TiO_x-Schichten (links). UV-VIS-Spektrum einer auf ein BK-7-Glassubstrat gesputterten TiO_x-Schicht (rechts). Deutlich zu sehen ist die Bandenverschiebung auf 320 nm nach Sputtern von TiO_x

4.1.2 Silanisierung, Biotinylierung und Chemisorption von Streptavidin auf TiO_x

Der Aufbau einer molekularen Biofunktionalisierung auf der TiO_x-Modelloberfläche wurde mit SPR, FT-IRRAS, Ellipsometrie und Kontaktwinkelmessungen nachverfolgt. Im IRRAS-Spektrum zeigten sich nach jedem Funktionalisierungsschritt charakteristische Banden der immobilisierten Moleküle (Tabelle 4-1; Abb. 4-2). Mit SPR wurde nach Applikation des biotinylierten Aminosilans auf TiO_x

(bTiO_x) eine durchschnittliche Schichtdicke von 0.9±0.4 nm aus 30 Versuchen ermittelt. Die Adsorption des Streptavidinmonolayers konnte in Echtzeit beobachtet werden. Der Mittelwert der Streptavidin-Schichtdicke aus den Fresnel-Fits von 30 Versuchen lag bei 3.9±0.5 nm. Ellipsometrische Messungen vom Aufbau des Schichtsystems auf SiO₂-Wafern ergaben für Aminosilan eine Schichtdicke von 0.7±0.2 nm, für Biotin 0.8±0.2 nm. Nach Immobilisation von Streptavidin betrug die Schichtdicke 2.5±0.2 nm. Der Kontaktwinkel der TiO_x-Modellschicht sank nach Immobilisation der biotinylierten Silanschicht von ca. 75° auf unter 50°. Nach Adsorption des Streptavidinmonolayers sank der Kontaktwinkel auf ca. 28°. Die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Methoden sind zusammengefasst in Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: Ergebnisse verschiedener Untersuchungen der Biofunktionalisierung einer TiO_x-Modellschicht.

| Schicht | SPR [nm] | Ellipsometrie [nm] | Kontaktwinkel [°] | IRRAS [cm⁻¹] |
|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| <i>TiO_x</i> | 5.0±1.5 | 1.9±0.3 | 78.6±1.9 | 3230 |
| <i>Aminosilan</i> | 0.9±0.4 | 0.7±0.2 | 50.0±2.2 | 1586; 2950 |
| <i>Biotin (bTiO_x)</i> | | 0.8±0.2 | 47.6±3.1 | 1650 |
| <i>Streptavidin</i> | 3.9±0.5 | 2.5±0.2 | 28.1±1.6 | 1740 – 1485 |

Die Veränderung des Kontaktwinkels mit der Lagerungsdauer von gesputterten TiO_x-Schichten hat keinen Einfluss auf die Biofunktionalisierung: Die Streptavidin-schichtdicke war bei den vielen einzelnen Messungen unabhängig von der Lagerungsdauer der Träger. Dies zeigte sich auch in Kontaktwinkelmessungen von Proben, die bis zu 4 Wochen gelagert wurden. Nach Applikation der Streptavidin-schicht sank der Kontaktwinkel reproduzierbar auf unter 30 °C ab. Die mit längerer Lagerungsdauer abnehmende Anzahl an O-H Terminierungen regenerierte sich bei Kontakt mit wasserhaltigen Lösungsmitteln wieder, sodass für jede Biofunktionalisierung gleiche Ausgangsbedingungen herrschten.

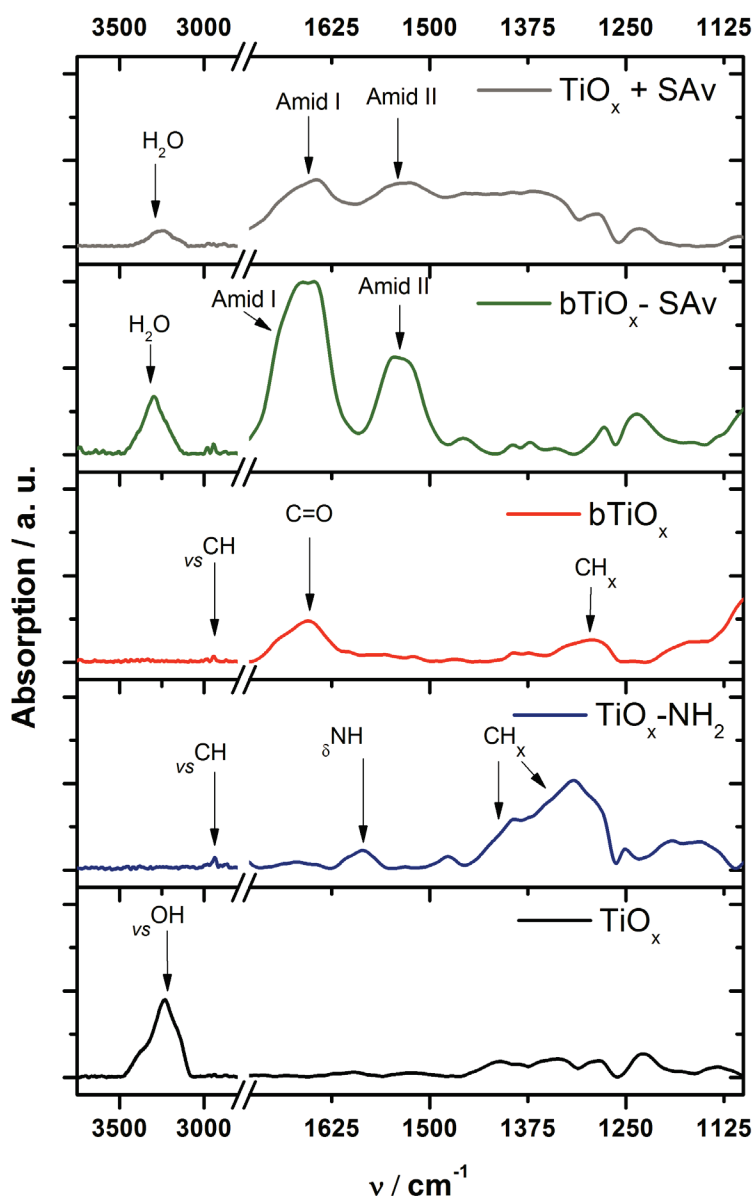


Abb. 4-2: FT-IRRAS einer TiO_x -Modellschicht (TiO_x), nach Aminoaktivierung ($\text{TiO}_x\text{-NH}_2$), Biotinylierung (bTiO_x) und nach Adsorption einer Streptavidinmonolage ($\text{bTiO}_x\text{-SAv}$). Für jeden Biofunktionalisierungsschritt konnten charakteristische Banden der adsorbierten Komponente zugeordnet werden. Wird Streptavidin (SAv) auf eine nicht-biofunktionalisierte TiO_x -Modellschicht gegeben, ist die Adsorption vernachlässigbar ($\text{TiO}_x + \text{SAv}$).

Die verschiedenen Schritte der Biofunktionalisierung lieferten in den jeweiligen IRRAS-Spektren eindeutige Signale der immobilisierten Molekülgruppe. Die Aminoaktivierung der TiO_x -Schicht mit AHAPTMS führte im IRRAS-Spektrum zum Verschwinden der OH-Streckschwingung der TiOH -Gruppen (3240 cm^{-1}). Stattdessen konnte eine N-H Biegeschwingung (1586 cm^{-1}) und eine C-N-Streckschwingung beobachtet werden (1315 cm^{-1}). Auch die C-H Streckschwingungen des Aminosilans bei 2950 cm^{-1} waren sichtbar. Bei der Biotinylierung erfolgte ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe auf den Kohlenstoff der Carbonylgruppe

unter Ausbildung einer Amidbindung. Daher waren die N-H Biegeschwingung und die C-N Schwingung nicht mehr sichtbar, stattdessen zeigte die C=O Streckschwingung (1650 cm^{-1}) eine erfolgreiche Kopplung des Biotins.^{(187),(188)} Durch die Immobilisation von Kohlenwasserstoffen mit Aminfunktionalisierung auf der TiO_x -Modelloberfläche veränderte sich der hydrophile Charakter. Dies konnte anhand eines Abfalls des Kontaktwinkels von 78° auf 50° beobachtet werden (Abb. 4-3). SAM mit vielen hydrophoben Kohlenwasserstoffgruppen verhindern oft eine gute Benetzbarkeit der Oberfläche. Da das Aminosilan aber zwei Aminogruppen besitzt, ist die Oberfläche insgesamt hydrophil. Andere Gruppen berichteten nach der Funktionalisierung von SiO_x -Oberflächen mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES) von Kontaktwinkeln um 58° bis 60° .^{(189)–(191)} Das in dieser Arbeit verwendete AHAPTMS besitzt zwei Aminogruppen, was den etwas hydrophileren Kontaktwinkel von 50° verglichen mit dem von APTES erklärt. Die Konjugation von Biotin an die aminfunktionalisierte Oberfläche führte zu einem Kontaktwinkel von $< 50^\circ$. Aufgrund des Ureido- und Tetrahydrothiophenrings war das Biotin polarer als das Aminosilan. Dies ist ebenfalls in Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Gruppen, die sogar Kontaktwinkel von Biotin-konjugierten APTES-Oberflächen bis 33° ermittelten.^{(190),(192)(193)} Der Unterschied kann auf die Biotinkopfgruppendichte zurückgeführt werden. Bei den in der Literatur berichteten geringeren Werten des Kontaktwinkels wurden höhere Biotinkonzentrationen eingesetzt, was eine höhere Kopfgruppendichte auf der Oberfläche zur Folge hat. Die korrekte Biotinkopfgruppendichte ist für die optimale Adsorption von Streptavidin aber entscheidend. Die Adsorption von Proteinen auf einer Oberfläche führt aufgrund geladener Gruppen im Protein generell zu einer Erhöhung der Hydrophilität.⁽¹⁹⁴⁾ Dies konnte durch einen deutlichen Abfall des Kontaktwinkels nach Adsorption von Streptavidin bestätigt werden. Dieser Abfall des Kontaktwinkels ist nicht auf das Lösungsmittel PBS zurückzuführen. Hier zeigte die Kontrolle von bTiO_x in PBS nur eine geringfügige Kontaktwinkelreduktion.

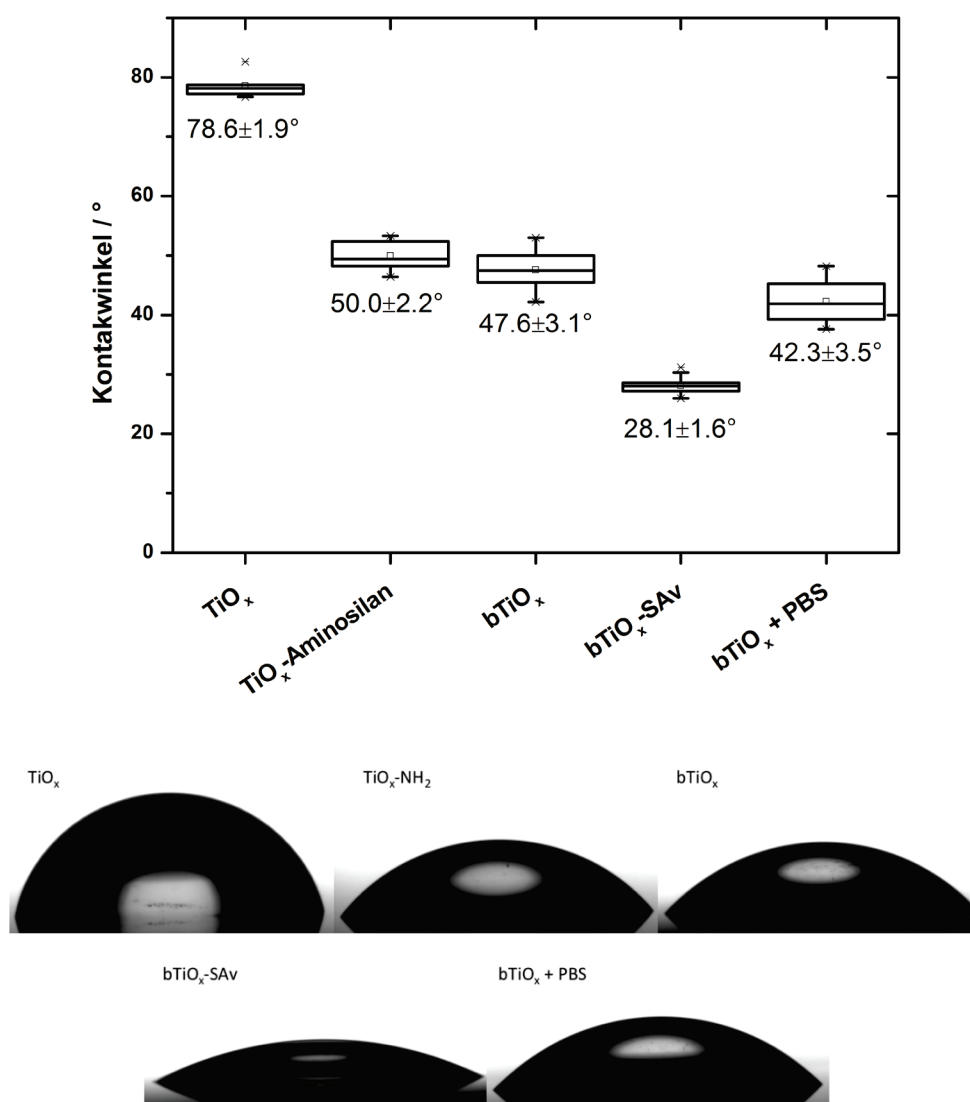


Abb. 4-3: Kontaktwinkel einer gesputterten TiO_x -Oberfläche vor und nach der Biofunktionalisierung mit Biotin und Streptavidin. Der Kontaktwinkel sinkt nach Silanisierung und Biotinylierung (bTiO_x) aufgrund polarer Gruppen auf der Oberfläche, bevor er durch den Streptavidinmonolayer ($\text{bTiO}_x\text{-SAV}$) aufgrund geladener Gruppen im Protein signifikant absinkt (Student's *t*-test, $p = 0.001$). Auf der Kontrolle von biotinyliertem TiO_x nur mit PBS sank der Kontaktwinkel geringfügig ab.

Die Adsorption von Streptavidin im IRRAS-Spektrum resultierte in deutlich sichtbaren Amidbanden ($1740 - 1485 \text{ cm}^{-1}$). Eine quantitative Bestimmung der adsorbierten Menge an Streptavidin war mit SPR-Spektroskopie möglich. Hierbei zeigte sich nach einem Fresnel-Fit der Oberfläche eine Schichtdicke von $3.9 \pm 0.5 \text{ nm}$ (Abb. 4-4; Abb. 4-5). Auf einem hochreinen Siliziumwafer konnte die Applikation des Schichtsystems zusätzlich mit Ellipsometrie beobachtet werden. Mit Ellipsometrie können Schichtdickenänderungen im Å-Bereich detektiert werden. Nachteil ist die Beschränkung durch die verwendete Apparatur auf Messungen gegen Luft. Das angrenzende Medium füllt die Zwischenräume zwischen den Streptavidinmolekülen aus. Da Luft mit 1.00058 einen deutlich geringeren Brechungsindex hat als PBS mit

1.36, erscheint im Mittel die Schichtdicke mit 2.5 ± 0.2 nm bei ellipsometrischen Messungen geringer als im SPR mit 3.9 ± 0.5 nm. Dies ist ebenfalls in Übereinstimmung mit ellipsometrischen Messungen eines Streptavidinlayers anderer Arbeitsgruppen.⁽¹⁹⁰⁾

Unter der Annahme einer Streptavidinmonolayer-Schichtdicke von 4.8 nm^{(195),(196)} ergibt dies einen Bedeckungsgrad von etwa 86 %. Die unspezifische Streptavidinadsorption auf einer unbiotinylierten Oberfläche ergab eine vernachlässigbare Schichtdicke von 0.4 nm, was einem Bedeckungsgrad von 9 % entspricht. Dies belegt die hochgradig spezifische Immobilisation von Streptavidin, wie bereits von Lehnert in Vorarbeiten entwickelt.⁽¹⁶⁾ In dieser Arbeit konnte mit 45 min Inkubation einer 750 nM Streptavidinlösung auf eine biotinylierte TiO_x -Modellschicht durchgängig eine Schichtdicke um 4 nm erreicht werden. Damit bestätigen sich die von Lehnert et al. erreichten Streptavidin-Schichtdicken.⁽²²⁾ Eine Verbesserung ergibt sich nur hinsichtlich der verkürzten Inkubationszeit von Streptavidin auf 45 min. Visualisierungen von Lehnert et al. mittels AFM zeigen dichte Cluster von Streptavidin auf der Oberfläche.⁽²⁰⁾ Die dichte Bedeckung mit Streptavidinmolekülen auf der Oberfläche ist Basis für die spezifische Anbindung biotinylierter Moleküle.

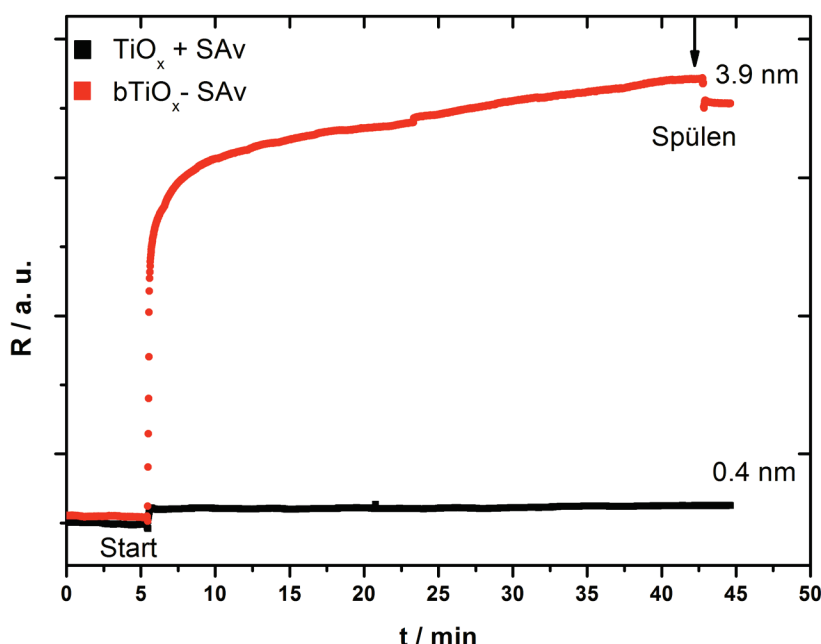


Abb. 4-4: Gemittelte Kinetiken aus 30 Ansätzen von 750 nM Streptavidin auf nativem TiO_x und bTiO_x . Streptavidin kann auf nativem TiO_x nicht spezifisch binden. Die resultierenden Schichtdicken aus den Fresnel-Fits ergaben 3.9 ± 0.5 nm.

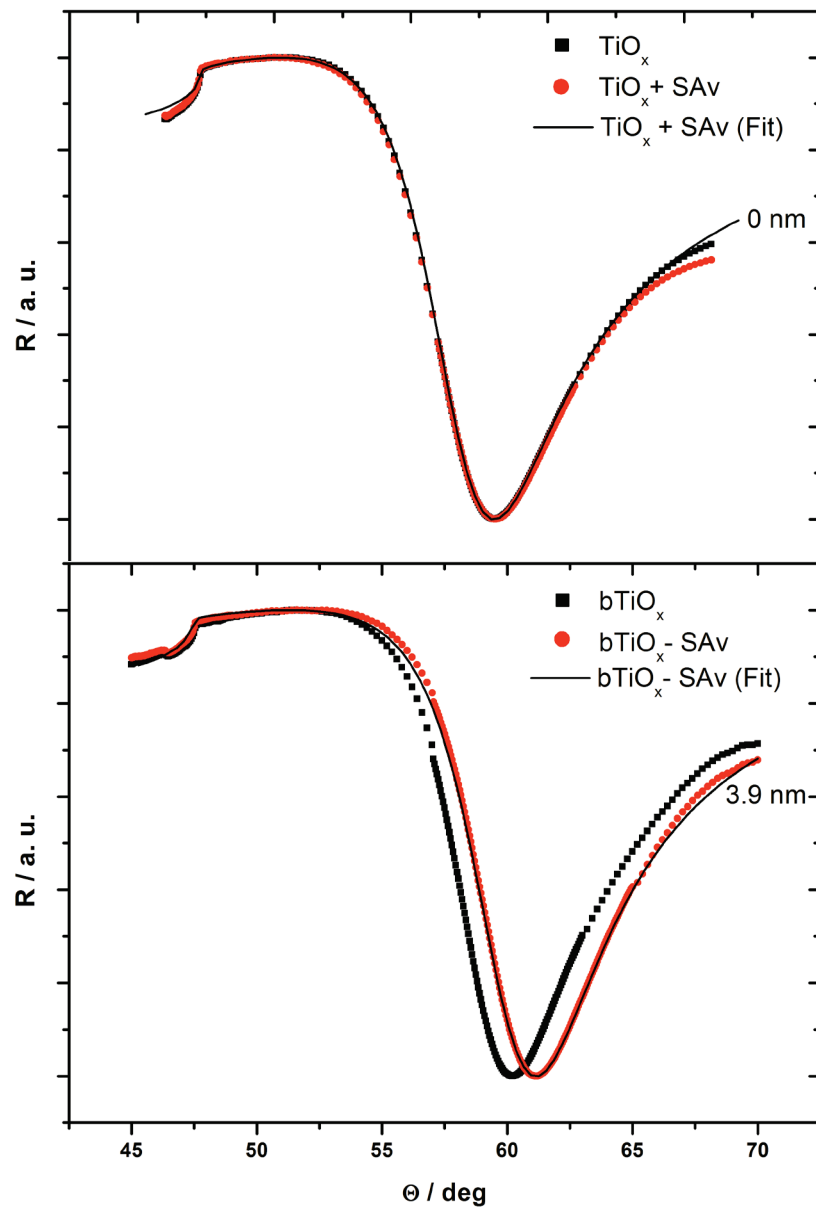


Abb. 4-5: SPR-Scans von Streptavidin auf nativem TiO_x (oben) und biotinyliertem TiO_x (unten). Die Bindung von Streptavidin (SAv) an bTiO_x ist hochgradig spezifisch.

4.2 Eigenschaften des molekularen Schichtsystems

4.2.1 Unterdrückung nicht-spezifischer Proteinadsorption

Die Echtzeitkinetiken sowohl von Lysozym als auch von BSA auf Streptavidin-biofunktionalisierten TiO_x -Modelloberflächen (vgl. Abb. 1-2) zeigten für physiologische Konzentrationen⁽¹⁹⁷⁾ (60 mg mL^{-1}) bei Injektion in die Messzelle einen Sprung des Reflektivitätssignals aufgrund des deutlich unterschiedlichen Brechungsindex der Lösung. Nach diesem Sprung gab es aber im Verlauf des gemessenen Intervalls keinen weiteren Anstieg. Nach vorsichtigem Spülen (1 mL min^{-1}) fiel das Reflektivitätssignal wieder auf den Anfangswert zurück. Die dazugehörigen SPR-Scans zeigten keine Verschiebung nach der Messung, die Schichtdicke an adsorbiertem Protein betrug 0.2 nm . Auf unbeschichteten TiO_x -Modelloberflächen ergab ein Fit der SPR-Scans nach Adsorption der physiologisch konzentrierten Proteinlösungen eine adsorbierte Schichtdicke von 4.4 nm (Abb. 4-7). Diese unspezifisch adsorbierte Proteinschicht ist irreversibel an das TiO_x gebunden.

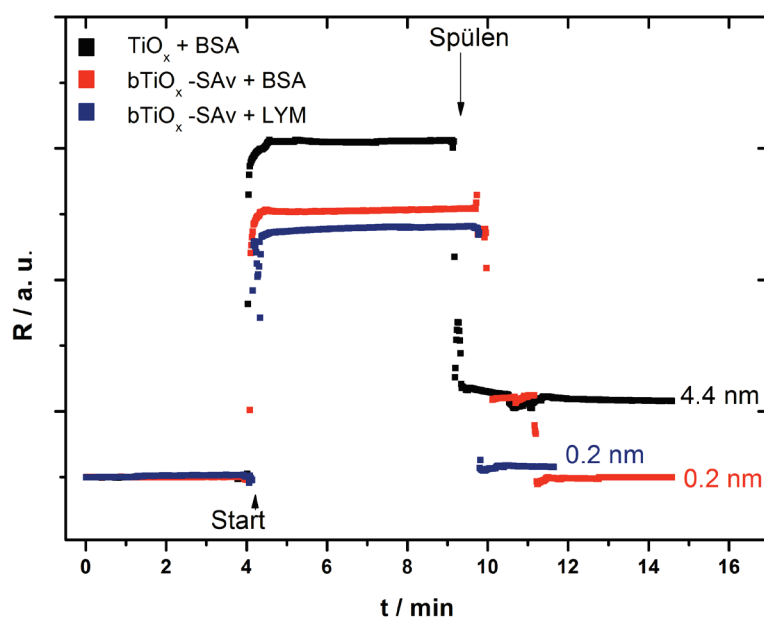


Abb. 4-6: Kinetik in Echtzeit der Adsorption einer hochkonzentrierten BSA- und LYM-Lösung (60 mg mL^{-1}) auf einer TiO_x - und einer Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x -Oberfläche (b TiO_x -SAv).

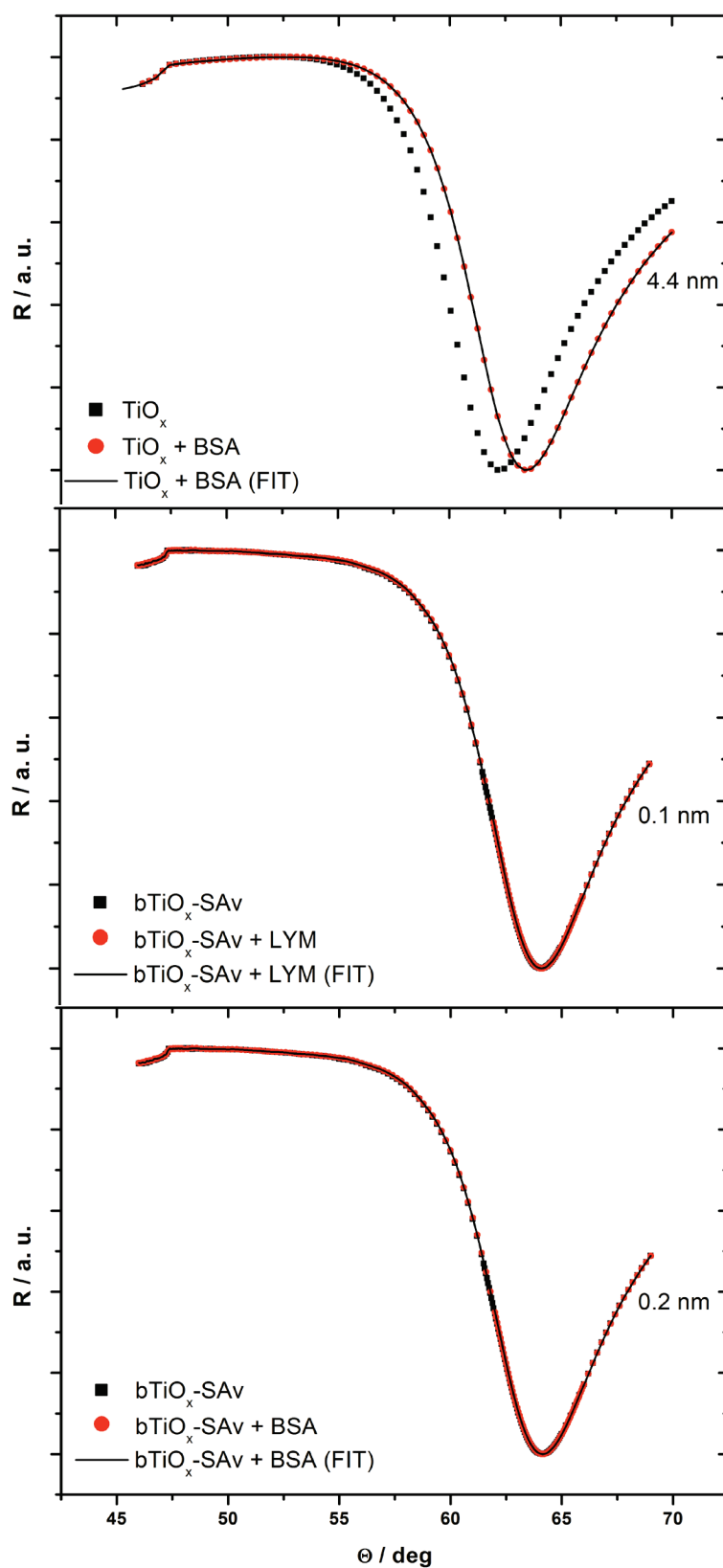


Abb. 4-7 : Die entsprechenden SPR-Scans nach der Adsorption von BSA auf TiO_x (oben) und auf $\text{bTiO}_x\text{-SAV}$ (Mitte) sowie von LYM auf $\text{bTiO}_x\text{-SAV}$ (unten) zeigen eine Unterdrückung der Adsorption durch eine Funktionalisierung mit Streptavidin.

Als weitere Kontrolle wurde eine mit PEG-funktionalisierte Goldoberfläche ebenfalls in einer physiologisch konzentrierten Proteinlösung von BSA und Lysozym inkubiert. PEG-funktionalisierte Oberflächen gelten als der Goldstandard für Oberflächen, die unspezifische Adsorption unterbinden.^{(198),(199)} Für beide Proteine ergab der resultierende Fresnel-Fit eine Schichtdicke von 0.4 nm, was im Rahmen der Messungenauigkeit des Gerätes liegt (Abb. 4-8). Daraus kann gefolgert werden, dass die Unterdrückung der unspezifischen Proteinadsorption durch einen Streptavidinmonolayer hinsichtlich der Effizienz vergleichbar mit PEG-funktionalisierten Oberflächen ist.

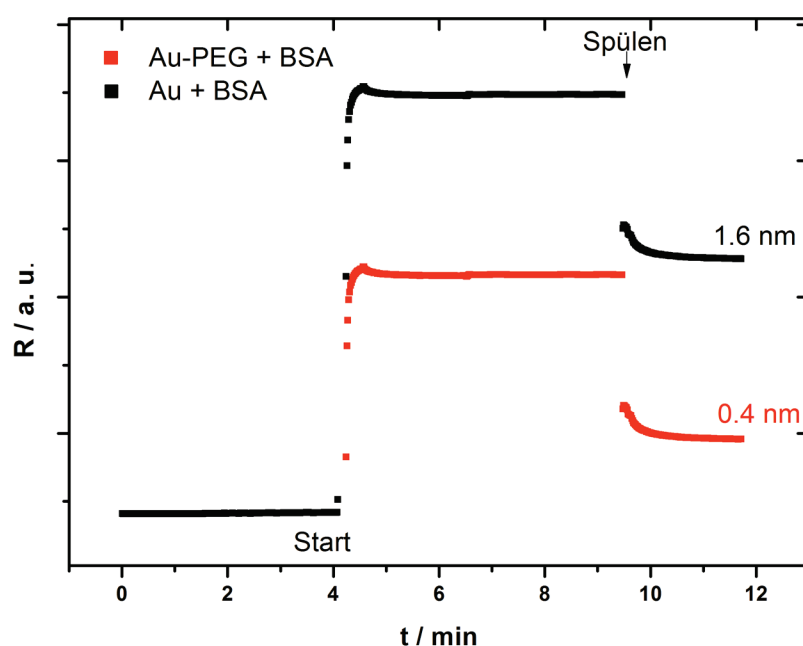


Abb. 4-8: Kinetik in Echtzeit der Adsorption einer hochkonzentrierten BSA-Lösung (60 mg mL^{-1}) auf eine Gold- und PEG-funktionalisierte Goldoberfläche.

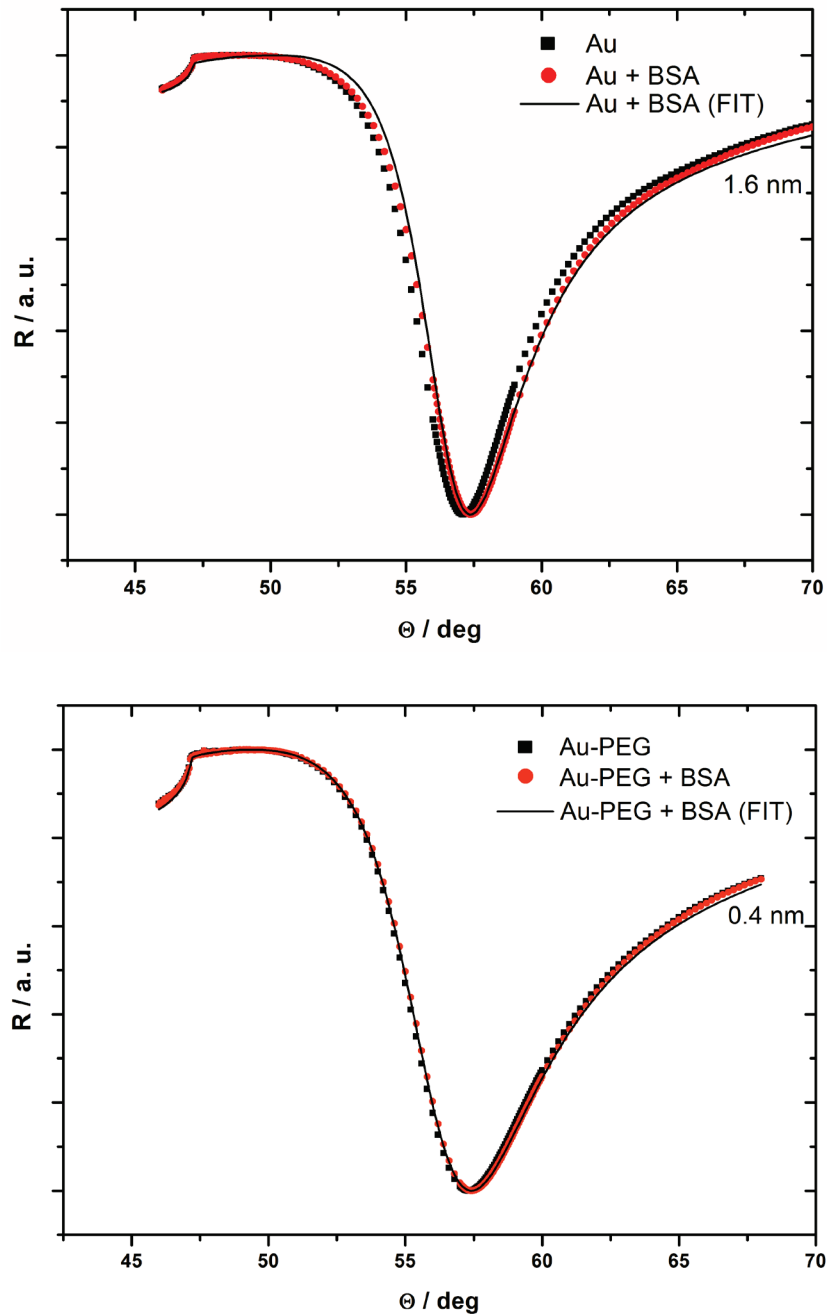


Abb. 4-9: Die entsprechenden SPR-Scans nach der Adsorption von BSA auf Gold (oben) und auf Gold-PEG (unten) zeigen eine Unterdrückung der Adsorption durch eine PEG-Funktionalisierung.

Die Unterdrückung der nichtspezifischen Adsorption durch einen Streptavidinmonolayer von Proteinen wurde anhand der Adsorption von BSA und Lysozym untersucht. BSA wurde hierbei als Modell für ein Plasmaprotein gewählt, das den Großteil der Proteine im Blutplasma ausmacht. Lysozym wurde aufgrund seines basischen pI als ein Protein gewählt, welches aufgrund seiner Ladung elektrostatisch auf einer Oberfläche adsorbieren kann.⁽²⁰⁰⁾ Lehnert et al. zeigten bereits, dass ein Streptavidinmonolayer die unspezifische Proteinadsorption in

geringen Konzentrationen bis 500 nM unterdrückt.⁽²¹⁾ Dies wurde bisher aber nicht für eine physiologisch relevante Proteinkonzentration gezeigt, die bis zu 60 mg mL⁻¹ (entspricht dem 1800-fachen der in Vorarbeiten gemessenen Konzentrationen⁽²¹⁾) im Blutplasma beträgt. Dieses Resultat ist im Kontext der Biofunktionalisierung von Implantaten von großer Bedeutung. Wird ein Implantat eingebaut, so kommt es an der Grenzfläche zwischen oxidischer Oberfläche und Interstitium zum Kontakt mit Blut und Gewebeflüssigkeit. Dabei lagern sich zunächst Wassermoleküle und Ionen an. Über elektrostatische Attraktion adsorbieren unspezifisch Proteine auf der Oberfläche und es lagert sich eine unspezifische Proteinmischschicht an. Diese Proteinmischschicht ist für die Bioaktivität von Implantaten problematisch, auf denen z. B. Wachstumsfaktoren durch Physisorption gebunden sind. Diese werden sehr schnell von dieser unspezifischen Proteinschicht überlagert, was ihren biologischen Effekt erheblich mindert.⁽¹³⁾ Zudem ist eine unspezifische Proteinmischschicht Voraussetzung für bakterielle Adsorption.⁽²⁰¹⁾ Biofunktionalisierungsansätze, die unspezifische Adsorption verhindern und zugleich aber spezifische Wechselwirkungen mit körpereigenen Zellen ermöglichen, besitzen einen großen Vorteil gegenüber herkömmlichen Ansätzen. Die herkömmlichen Ansätze beruhen meist auf den antiadhäsiven Eigenschaften von PEG oder anderen self-assembled Monolayern (SAM). Der hier vorgestellte Ansatz bietet somit eine vielversprechende Alternative zu den herkömmlichen Ansätzen.

4.2.2 Unterdrückung nicht-spezifischer und spezifischer Adsorption von Bakterien

Die frühe Adsorption von Bakterien (innerhalb der ersten 30 bis 60 min) wurde auf Streptavidin-biofunktionalisierten und unbeschichteten TiO_x-Modelloberflächen in einem Adhäsionsassay untersucht. Dabei zeigte sich für alle verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, *B. subtilis* und *S. intermedius*) eine signifikante Reduktion ($p = 0.001$, Kruskal-Wallis) der bakteriellen Adsorption, dargestellt durch die Fähigkeit zur Kolonisation (Abb. 4-10, Abb. 4-11, Abb. 4-12) auf Streptavidin-biofunktionalisierten Oberflächen im Vergleich zu unbeschichteten TiO_x-Modelloberflächen. Die Zusammenschau der Unterdrückung unspezifischer Proteinadsorption und bakterieller Adsorption legt den Schluss nahe, dass der Streptavidinmonolayer bereits die Grundlage für bakterielle Adsorption unterbindet. Sie ist nicht zwingend auf einen bakteriziden Effekt zurückzuführen, obgleich dieser zweifelsohne existiert.^{(202),(203)}

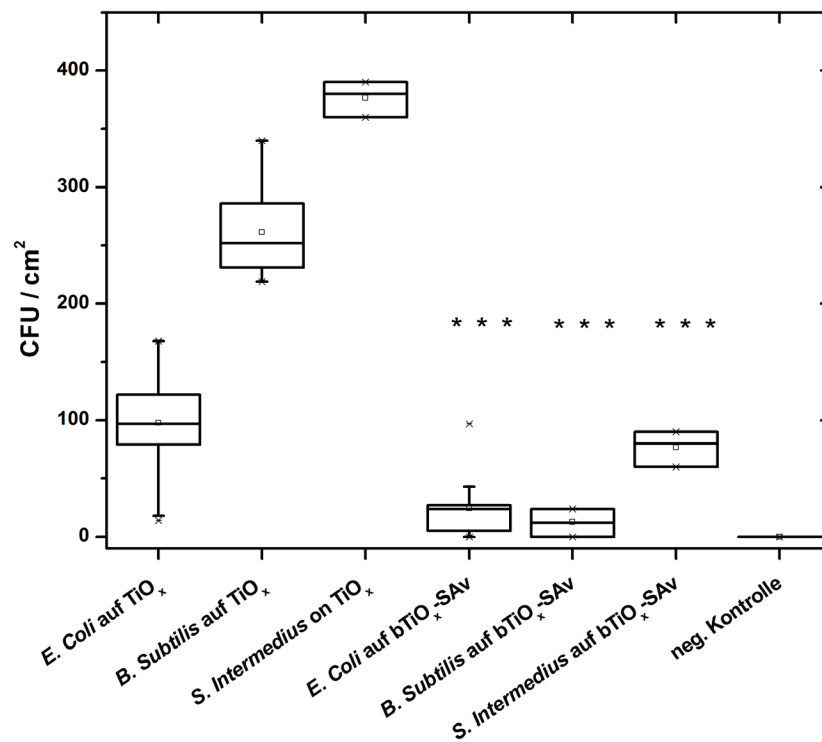


Abb. 4-10: Reduktion der Bakterienkolonien (CFU) auf der TiO_x-Modelloberfläche und bTiO_x-Streptavidin-Modellschichten. Die Reduktion ist in allen Fällen hoch signifikant ($p=0.001$, Kruskal-Wallis).

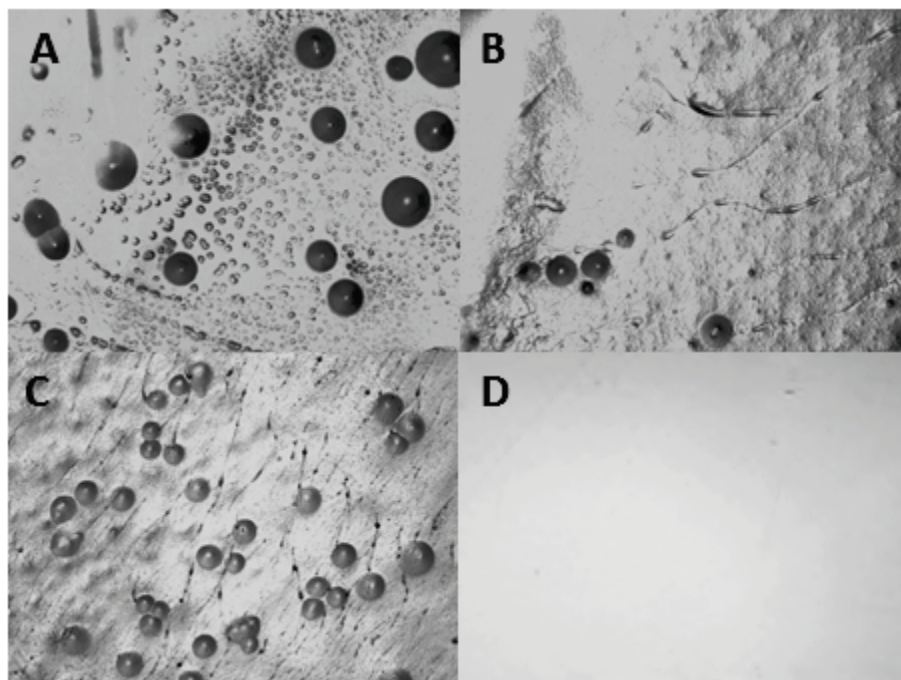


Abb. 4-11: Laserkonfokalmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* auf TiO_x (A), bTiO_x-SAV (B), Positivkontrolle auf Glas (C) und der Negativkontrolle (D). Auf bTiO_x-SAV sind sichtbar weniger Kolonien gewachsen als auf TiO_x.

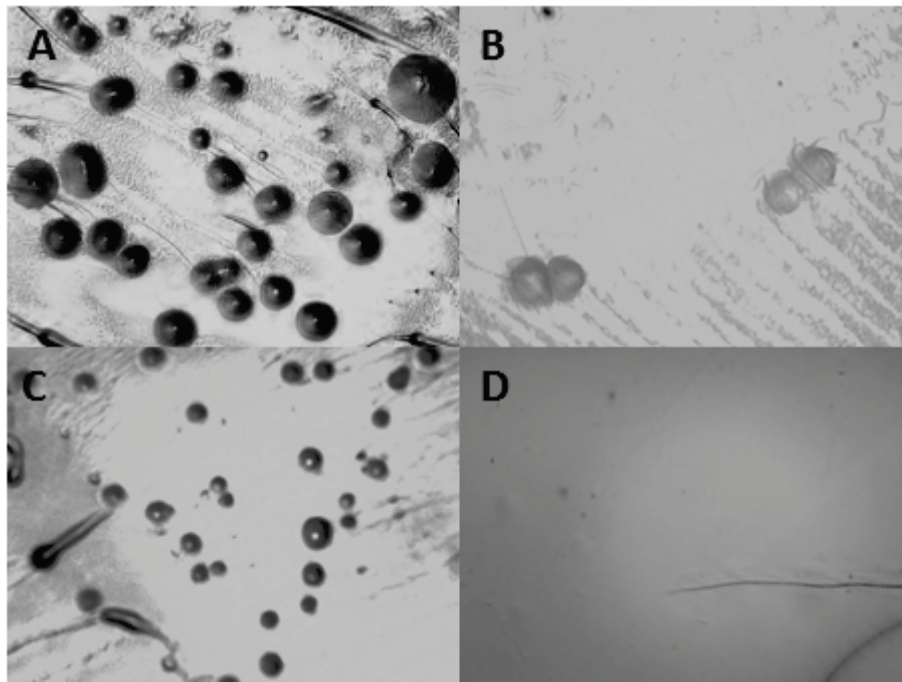


Abb. 4-12: Laserkonfokalmikroskopische Aufnahmen von *B. subtilis* auf TiO_x (A), $\text{bTiO}_x\text{-SAV}$ (B), Positivkontrolle auf Glas (C) und der Negativkontrolle (D). Auf $\text{bTiO}_x\text{-SAV}$ sind erkennbar weniger Kolonien gewachsen als auf TiO_x .

Für die Untersuchung bakterieller Adsorption an Oberflächen gibt es kein einheitliches Bestimmungsverfahren. Die antibakteriellen Eigenschaften vieler Titanoxidschichten werden untersucht, indem vollständige Biofilme über mehrere Tage darauf gebildet werden. Für die Untersuchung des initialen Adsorptionsprozesses ist es aber wichtig, Einblicke über die ersten Minuten *post implantatio* zu bekommen, in denen die Implantatoberfläche in Kontakt mit dem umliegenden Gewebe und infolgedessen auch mit Bakterien kommt. Daher wurde in den vorliegenden Versuchen, modifiziert nach Haldar et al.,⁽¹⁶³⁾ eine kurze Expositionszeit der Oberfläche mit Bakterien gewählt. Dies erscheint im Lichte der Grenzflächenprozesse sinnvoll, da kurz nach der Implantation Bakterien und körpereigene Zellen durch den Vroman-Effekt um die Besiedlung der Oberfläche konkurrieren („race for the surface“).⁽²⁰⁴⁾

Die unspezifische Adsorption von Bakterien wurde untersucht am Modell von *E. coli* und *B. subtilis*, die sich in der Zusammensetzung ihrer Zellwand unterscheiden. *E. coli* ist gramnegativ, *B. subtilis* ist grampositiv. Die Adsorptionsmechanismen von grampositiven und gramnegativen Bakterien sind unspezifischer Natur, da beide keine spezifischen Pili für Adsorption besitzen. Grampositive Bakterien besitzen eine dicke Mureinhülle aus Peptidoglycan. Diese enthält die Lipoteichonsäure, die

bei Adsorptionsprozessen eine wichtige Rolle spielt.⁽²⁰⁵⁾ Lipoteichonsäure besteht aus einem Membrananker aus Glycolipiden und einer Phosphoglycerolphosphatkette. Die nach außen ragende Phosphoglycerolphosphatkette ist stark negativ geladen und entscheidend bei der Adsorption von Bakterien an Zellen oder Oberflächen.⁽²⁰⁶⁾ Gramnegative Bakterien besitzen keine Lipoteichonsäure, sondern stattdessen negativ geladene Lipopolysaccharide (LPS), die bei der Adsorption gramnegativer Bakterien ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.⁽²⁰⁷⁾ Die taxonomische Unterscheidung zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien ist auch in der Implantologie von hoher klinischer Relevanz. Die Adsorption von beiden bakteriellen Spezies kann durch eine Biofunktionalisierung der Implantatoberfläche mit Streptavidin verhindert werden.

S. intermedius ist ein pathogenes Bakterium, welches mit periodontalen Entzündungsprozessen im Zusammenhang steht.⁽²⁰⁸⁾ Dabei steht es bei der Biofilmbildung meist an erster Stelle, bevor hochgradig pathogene Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis* überhaupt adhärieren können.⁽²⁰⁹⁾ Daher ist es von besonderem Interesse, eine Unterdrückung solcher „Entzündungsvermittler“ zu erreichen. Die direkte Adsorption von *P. gingivalis* an eine Oberfläche ist unwahrscheinlich, erst durch Bildung eines initialen Biofilms durch Bakterien wie *S. intermedius* wird deren Adsorption deutlich wahrscheinlicher.⁽²¹⁰⁾ Die Adsorption von *P. gingivalis* wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht, allerdings wuchsen die Bakterien nicht einmal auf der TiO_x-Kontrolloberfläche, weshalb es nicht als geeignetes Modell für die Untersuchungen des bakteriellen Adsorptionsverhaltens in Frage kam. *S. intermedius* ist in der Lage, spezifisch über Adsorptionspili an Oberflächen zu binden. Der vorgestellte Biofunktionalisierungsansatz beugt auch der Adsorption von Bakterien, die über spezifische Adsorptionsmechanismen verfügen, vor. Da es allerdings bakterielle Spezies gibt, deren spezifischer Adsorptionsmechanismus auf anderen Erkennungssequenzen beruht, ist dieses Ergebnis nicht auf jede bakterielle Spezies zu übertragen. Dies müsste für jede entsprechende Art untersucht werden. Trotzdem zeigt dieses Ergebnis, dass die Unterdrückung der Adsorption von Bakterien durch spezifische Mechanismen *prinzipiell* durch das Schichtsystem möglich ist.

Eine weitere Fragestellung ergibt sich nach der molekularen Ursache dieser antiadhäsiven Eigenschaften des Streptavidinmonolayers. Prinzipiell wird die Adsorption von Bakterien auf eine Oberfläche durch eine unspezifische Protein-

mischschicht begünstigt.^{(11),(14),(211)–(214)} Diese unspezifische Proteinmischschicht wird auch Konditionierungsfilm genannt. Streptavidin unterbindet die Ausbildung dieses Konditionierungsfilms.⁽²¹⁵⁾ Streptavidin ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 6.8 – 7.5 in Lösung und 5.5 als Monolayer.⁽²¹⁶⁾ Die Oberfläche des Proteins ist also nahezu ungeladen, sodass die elektrostatische Anziehung von Molekülen unterbunden wird.⁽²¹⁷⁾⁽²¹⁸⁾ Zusätzliches Gewicht bekommt dieses Argument, wenn strukturell ähnliche Biotin-bindende Proteine zum Vergleich herangezogen werden: Avidin ist ebenfalls ein tetrameres Protein mit einer hohen Affinität (10^{15} M^{-1}) zu Biotin, bedingt durch eine strukturell dem Streptavidin ähnliche Bindungssequenz.⁽²¹⁹⁾ Avidin besitzt eine Glykosylierung auf der Oberfläche, was einen basischen pI von 10 zur Folge hat.⁽²²⁰⁾ Avidin wird wegen seiner hohen Affinität ebenfalls in biosensorischen Anwendungen eingesetzt, ist dort aber für Probleme aufgrund seiner hohen unspezifischen Adsorption bekannt. Ein weiteres molekularbiologisch hergestelltes Biotin-bindendes Protein, NeutrAvidin, besitzt keine Glykosylierung auf der Oberfläche. Es besitzt einen neutralen pI (6.3) und wird aufgrund seiner geringen unspezifischen Adsorption in biosensorischen Applikationen verwendet.⁽²²⁰⁾ Auch wenn die fehlende Glykosylierung sicherlich ein Schlüsselfaktor für die antiadhäsiven Eigenschaften ist, werden zudem sterische Behinderungen und diskrete molekulare Wechselwirkungen als Faktoren diskutiert, die antiadhäsive Eigenschaften von Streptavidin begünstigen. Ein Streptavidin-monolayer auf der Oberfläche ist sehr dicht gepackt, wie bereits im Rahmen einer vorherigen Dissertation in der AG Biophysik (Prof. Dr. M. Veith) gezeigt werden konnte.^{(16),(21)} Das Streptavidin exponiert zudem ungeladene, hydrophobe Reste an der Oberfläche, und zwar dreifach so häufig wie geladene Reste (Abb. 4-13).

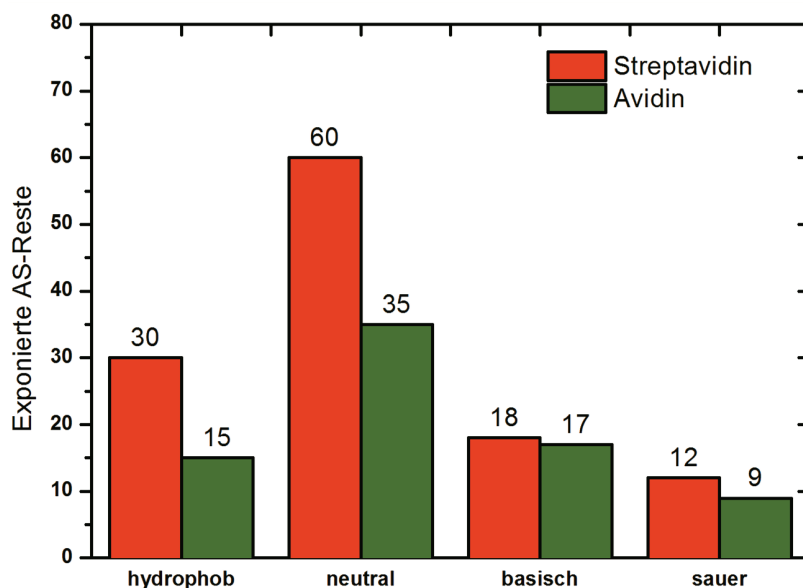


Abb. 4-13: Anzahl der Aminosäurereste und deren Charakteristika an der Oberfläche von Avidin und Streptavidin. Während die Anzahl der geladenen Reste nicht signifikant unterschiedlich ist, ist die Anzahl der hydrophoben und neutralen Reste im Streptavidin doppelt so hoch.

Die antiadhäsiven Eigenschaften von SAMs, die ebenso hydrophobe oder ungeladene Reste exponieren, werden damit erklärt, dass es keine Donorgruppen für potentielle Wasserstoffbrückenbindungen gibt.^{(200)(199),(221)–(223)} Da auch Streptavidin viele hydrophobe und ungeladene Gruppen auf der Oberfläche besitzt, kann dies ebenfalls als Erklärungsansatz herangezogen werden. Unterstützt wird diese Argumentation durch die Tatsache, dass das Analogon Avidin auf der Oberfläche deutlich mehr geladene Gruppen besitzt (Abb. 4-14). Avidin lässt deutlich mehr unspezifische Adsorption zu.

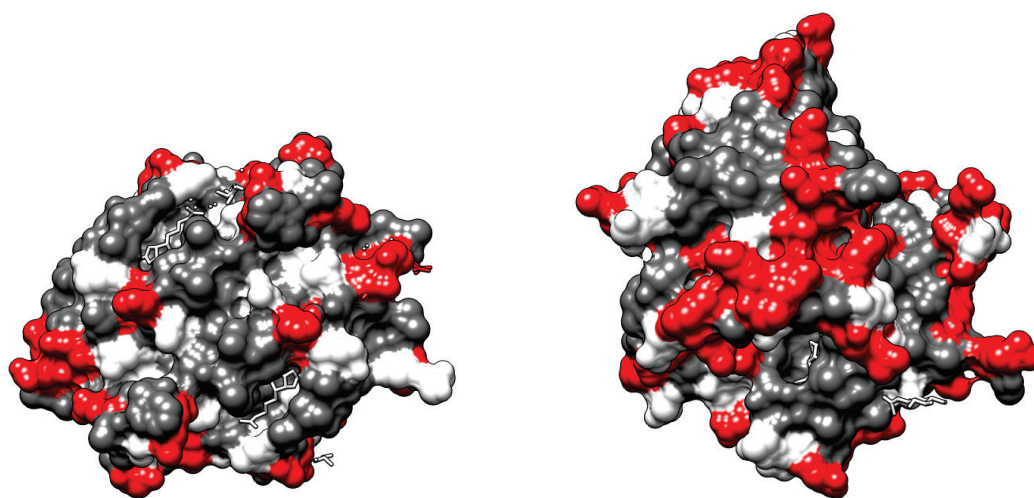
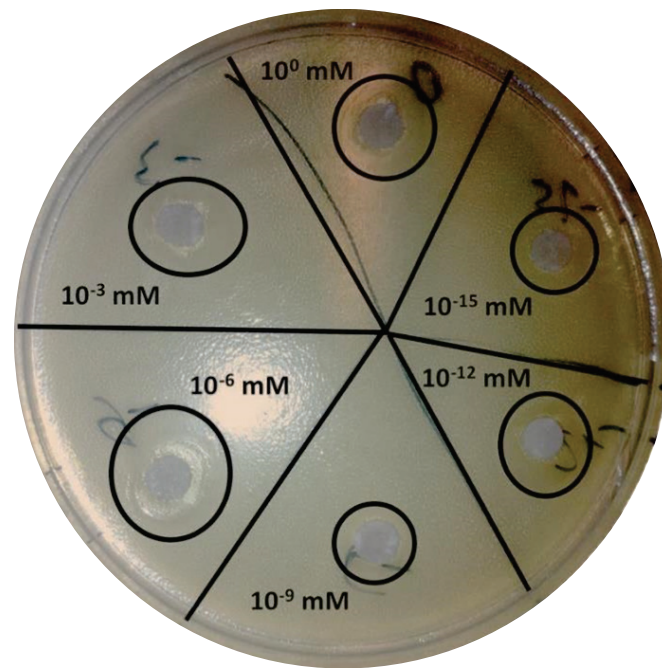


Abb. 4-14: Geladene Gruppen auf der Oberfläche von Streptavidin (links) und Avidin (rechts). Geladene Reste sind rot markiert, hydrophobe Reste grau. Bei Avidin sieht man deutlich mehr geladene Gruppen auf der Oberfläche. Die Glykosylierung ist nicht mit eingezeichnet.

Der dicht gepackte Streptavidinmonolayer auf der Oberfläche bei einem Bedeckungsgrad von 85 % lässt räumlich betrachtet auch nur eine vernachlässigbar geringe Möglichkeit für unspezifische Adsorption von Bakterien in den Zwischenräumen zu. Bakterien wie *E. coli* und *B. Subtilis* besitzen eine Fläche von ca. $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. Wie aus den AFM-Aufnahmen aus der Arbeit von Lehnert ersichtlich,⁽¹⁶⁾ sind die Räume für potentielle Adsorption zwischen den Streptavidin-Inseln deutlich kleiner. Daher sind unspezifische Adsorptionsprozesse von Bakterien mit der TiO_x -Modelloberfläche nicht möglich.

Auch die spezifische Adsorption von *S. intermedius* über Pili reicht nicht aus, dass das Bakterium in großen Mengen auf der Oberfläche binden kann. Die Größe der Kontaktfläche der Pili beträgt zwar nur wenige nm^2 – damit kann ein Bakterium potentiell auch in die Zwischenräume der Streptavidininseln eindringen –, allerdings reicht dieser Kontakt allein nicht für eine starke Adsorption auf der Oberfläche. Da viele pathogene Bakterien ähnliche Adsorptionsmechanismen besitzen, werden vergleichbare Effekte eines Streptavidinmonolayers auf deren Adsorption erwartet. Dies bleibt allerdings noch zu untersuchen, ebenso die Adsorption dieser Bakterien auf weitergehend biofunktionalisierte Oberflächen (z. B. mit biotinyliertem Fibronectin). Hierbei ist es möglich, dass spezifische bakterielle Pili auf Fibronectinmolekülen bestimmte Erkennungssequenzen registrieren und daran adhäreren. Da der Bedeckungsgrad mit Fibronectin aber in durchgeführten Versuchen etwa 75 % betrug,⁽¹⁶⁾ wird auch hier keine signifikante Erhöhung der bakteriellen Adsorption erwartet.



*Abb. 4-15: Hemmhoftest verschiedener Streptavidinkonzentrationen auf *E. coli*. Der schwarze Rahmen bezeichnet die Ausdehnung des Hemmhofs. Bei allen Konzentrationen sind im Bereich des Rahmens keine Bakterien gewachsen. Dies belegt eine antibakterielle Wirkung von Streptavidin.*

Streptavidin besitzt in Lösung zudem einen antibiotischen Effekt, der über einen Hemmhoftest ermittelt wurde (Abb. 4-15). Von bestimmten Spezies ist bekannt, dass sie Biotin-bindende Proteine als Verteidigungsmechanismen gegen Eindringlinge nutzen.^{(202),(203)} Da Biotin in nahezu allen prokaryotischen und eukaryotischen Lebensformen als essentieller Kofaktor im Glukose-, Aminosäuren- und Fettmetabolismus benötigt wird, können Eindringlinge so nicht überleben. Das auf einer Streptavidinoberfläche gebundene Streptavidin würde theoretisch ausreichen, um alles Biotin in den Bakterienzellen zu binden. Der Bedeckungsgrad mit Streptavidin beträgt 86 %, dementsprechend befinden sich bei einem Platzbedarf von 30 nm² pro Streptavidinmolekül etwa 2.86 x 10¹² Streptavidinmoleküle auf 1 cm². Diese können jeweils zwei Biotine binden, was einer Zahl von 5.72 x 10¹² Biotinmolekülen entspricht. Die Zahl der zugegebenen Bakterien betrug etwa 14.2 x 10⁷ cm⁻². Die physiologische Biotinkonzentration in der Bakterienzelle beträgt etwa 250 pmol L⁻¹.⁽²²⁴⁾ Das Volumen einer Bakterienzelle liegt bei ca. 2 x 10⁻¹⁵ L.⁽²²⁵⁾ Die Gesamtmenge an Biotin auf 1 cm² mit Bakterien beträgt demnach 71 Attomol. Dies entspricht einer Anzahl von etwa 42.5 x 10⁶ Biotinmolekülen pro cm². Diese können theoretisch von dem Streptavidin auf der Oberfläche aufgenommen werden, allerdings ist nicht bekannt, dass Biotin durch Membrankanäle aus der Zelle gelangt. Die antibiotische Wirkung von Streptavidin ist nur in Lösung belegt, nicht

aber in immobilisiertem Zustand. Zudem war in einer Lebend-Tot-Färbung der unbeschichteten TiO_x -Oberflächen und den mit Streptavidin-beschichteten Oberflächen auf letzteren keine erhöhte Zahl an toten Bakterien festzustellen. Dies spricht zusätzlich dafür, dass die geringe Adsorption von Bakterien auf Streptavidin-beschichtetem TiO_x nicht primär auf einer bakteriziden Wirkung beruht.

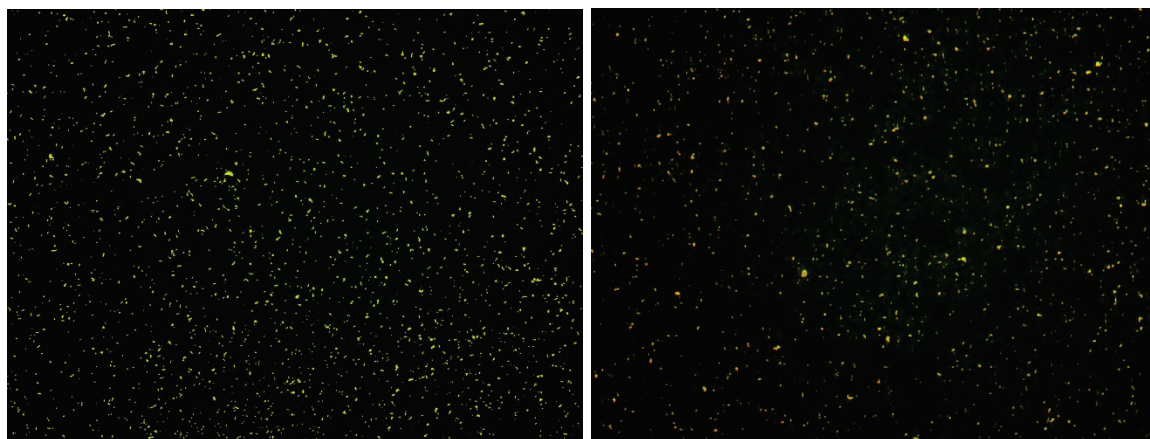


Abb. 4-16: Lebend/Tot-Färbung von unbeschichteten TiO_x Oberflächen (links) und $b\text{TiO}_x\text{-SAv}$ -beschichteten Oberflächen (rechts). Die Signale für lebend (grün) und tot (gelb) sind kolokalisiert und daher nicht zu quantifizieren. Allerdings ist die Anzahl der Signale auf den unbeschichteten Trägern höher, übereinstimmend mit den in Abb. 4-10 gezeigten Daten.

Hieraus kann geschlossen werden, dass die verminderte Adsorption nicht primär durch die potentiell antibiotische Wirkung von Streptavidin hervorgerufen wird, sondern vielmehr durch die antiadhäsiven Charakteristika des Streptavidins zustande kommt.⁽²²⁶⁾

Die klinische Relevanz dieses Ergebnisses ist besonders für die Applikation von Implantaten in Patienten mit einem erhöhten Infektionsrisiko von Bedeutung. Dazu zählen Diabetiker, Patienten mit rheumatischer Arthritis sowie immundefiziente Patienten.⁽²²⁷⁾ Eine bakterielle Infektion stellt dort immer noch die häufigste Ursache für einen Implantatverlust dar.^{(228)–(231)} Aufgrund der damit verbundenen Kosten und Unannehmlichkeiten für den Patienten ist das Verständnis und die Prävention bakterieller Adsorption an Implantate in der biomedizinischen Forschung ein Thema von großer Bedeutung.⁽²³²⁾ Behandlungen von Implantatinfektionen mit Antibiotika sind oft in einem fortgeschrittenem Stadium der Biofilmbildung nicht mehr möglich, da die Bakterien Kolonien bilden, die durch exopolymere Substanzen (EPS) geschützt sind. Dies verhindert ein Eindringen von Antibiotika in die Bakterienkolonie. So werden durch eine massive Antibiotika-

behandlung nur das Risiko einer chronischen Entzündung sowie die Entstehung resistenter Keime erhöht.^{(201),(233),(234)} Daher sind Forschungsansätze, die bakterielle Adsorption im Anfangsstadium durch Oberflächenmodifikationen unterbinden, erfolgsversprechender. Allerdings gibt es auch hier bisher noch kein System, das allen Kriterien für jede Implantatoberfläche entspricht.⁽²³⁵⁾ Zudem besteht bei stark antiadhäsiven Implantatoberflächen das Risiko, dass auch das Anwachsen körpereigener Zellen verhindert wird. Daher muss eine Diskriminierung zwischen der Adsorption bakterieller und körpereigener Zellen möglich sein. Da Streptavidin ein nicht-humanes Protein ist, kann es eine humorale Immunreaktion auslösen. Das Streptavidin-Biotin-System wurde bereits in den 1990er Jahren für Targetingzwecke in der Tumorforschung in der klinischen Phase I/II getestet.^{(236)–(240)} Hierbei konnten geringfügige Immunreaktionen beobachtet werden, wenn das Streptavidin frei zirkulierte.⁽²⁴¹⁾ Als Konjugat mit einem monoklonalen Antikörper konnte diese Immunreaktion nicht beobachtet werden.⁽²⁴²⁾ Den Patienten wurden hierbei 5 bis 50 mg Streptavidin injiziert.^{(240),(243)} Für einen Einsatz in Implantaten besteht die Gefahr einer systemischen Immunreaktion nicht. Kommerzielle Dentalimplantate haben eine Oberfläche von 70 bis 400 mm². Bei einem Bedeckungsgrad von 85 % und einer Fläche eines einzelnen Streptavidinmoleküls von 30 nm² können maximal 2×10^{12} bis 1.1×10^{13} Streptavidinmoleküle in den Blutkreislauf gelangen, falls sich die komplette Beschichtung ablösen sollte. Diese Menge entspricht max. 1.1 µg und liegt damit um den Faktor 5×10^3 bis 5×10^4 niedriger als in den klinischen Tests, ist also vernachlässigbar.

Das in dieser Arbeit eingeführte molekulare Schichtsystem bietet einen vielversprechenden Ansatz für Fortschritte auf diesem Gebiet. Aus Untersuchungen im Tiermodell ist zudem belegt, dass dieses Schichtsystem bei den auftretenden Scherkräften während der Implantation seine Biofunktionalisierung nicht verliert.⁽¹⁷⁾

4.2.3 Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau

Die Stabilität eines Streptavidinmonolayers auf TiO_x-Modelloberflächen wurde durch Verdau mit Proteinase K und Trypsin untersucht. Zum Vergleich wurde die Stabilität gegenüber proteolytischem Verdau durch Trypsin und Proteinase K in Lösung ermittelt.

Unter den Bedingungen für Totalhydrolyse zeigte sich eine Resistenz des Streptavidinmonolayers gegenüber dem Verdau mit jeweils beiden Proteinase (Abb. 4-17). Die SPR-Scans eines Streptavidinmonolayers sind vor und nach der Behandlung mit der Proteinase übereinstimmend, der resultierende Fresnel-Fit zeigt keine signifikante Abnahme der mit Protease behandelten Streptavidinschicht.

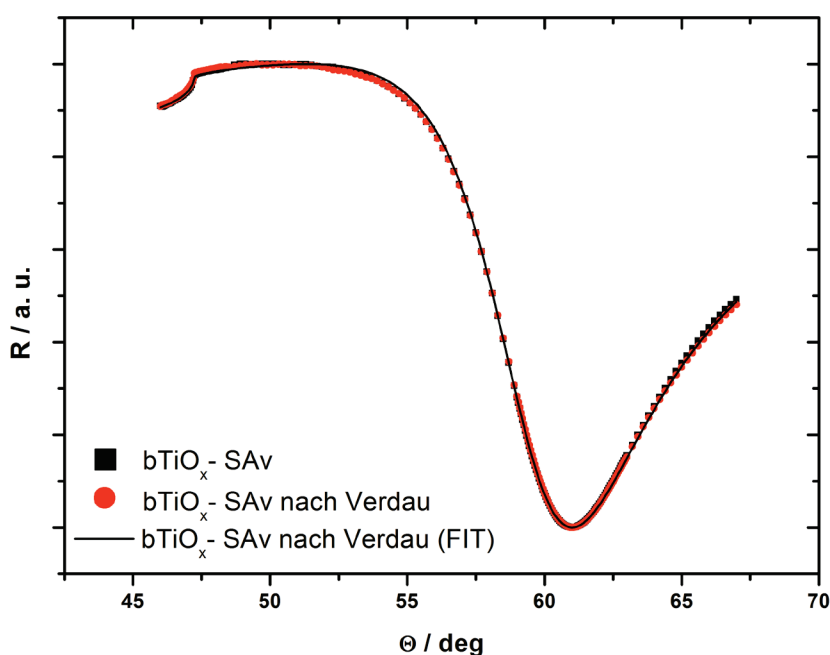


Abb. 4-17: SPR-Scan eines Streptavidinmonolayers auf TiO_x vor und nach dem Verdau mit Proteinase K. Es war keine Veränderung der Schichtdicke zu beobachten.

Mit Biotin abgesättigtes Streptavidin in Lösung ist ebenfalls resistent gegenüber dem Verdau. Die proteolytische Spaltung von gelöstem Streptavidin war nur in der Abwesenheit von Biotin (Abb. 4-18) und mit vorheriger Hitzedenaturierung von Streptavidin (95 °C, 10 min) möglich. Ohne vorherige Hitzebehandlung wird gelöstes Streptavidin durch die Bedingungen der SDS-PAGE nur vom Tetramer in Monomere denaturiert. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse übereinstimmend eine hohe Widerstandsfähigkeit von an Biotin gebundenem Streptavidin gegenüber proteolytischem Verdau.

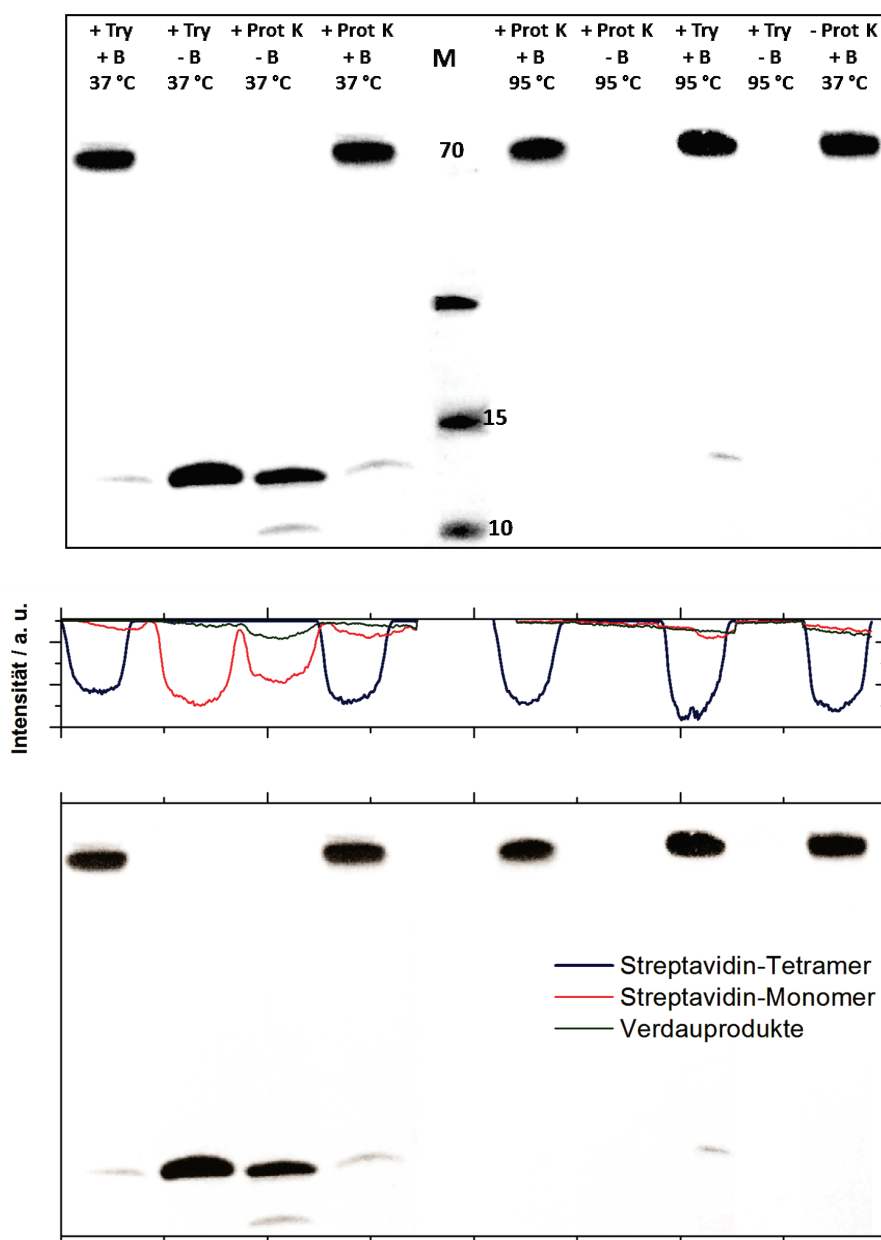


Abb. 4-18: SDS-PAGE eines Verdaus des Streptavidin-Biotin-Komplexes in Lösung mit Proteinase K und Trypsin (oben) und eine Analyse der Bandenintensität (unten). Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von Biotin weder Denaturierung durch die Bedingungen der SDS-PAGE noch eine Spaltung durch die Protease möglich war. Try: Trypsin, ProtK: Proteinase K, B: Biotin, M: Marker.

Die hohe Stabilität von Streptavidin in Biotin-gebundenem Zustand gegenüber Hitze und Proteolyse erfordert eine fundierte Erklärung. Die beiden Proteasen wurden gewählt, weil sie als besonders effiziente und etablierte Werkzeuge im Proteinverdau eingesetzt werden. Trypsin ist die meistgenutzte Protease in den *Proteomics*. Trypsin spaltet die Peptidbindung spezifisch nach einen Lysin- oder Argininrest. Dabei entstehen definierte, vorhersagbare Verdauprodukte. Proteinase K stammt aus dem Pilz *Engyodontium album* und spaltet Peptidbindungen, die neben den Carboxylgruppen von aliphatischen oder aromatischen

Aminosäureresten liegen. Da solche Aminosäurereste sehr häufig vorkommen, führt eine Proteolyse mit Proteinase K in aller Regel zur Totalhydrolyse der meisten Proteine.^{(244),(245)} Die beiden Proteasen wurden gewählt, um die Stabilität des Schichtsystems im extremsten Fall einer Entzündungsreaktion zu testen. Bei einer Entzündungsreaktion werden üblicherweise auch Proteasen von Immunzellen freigesetzt, die das molekulare Schichtsystem angreifen und so die Biofunktionalisierung erheblich schädigen könnten. Die Ergebnisse zeigen, dass biofunktionalisierte Implantatoberflächen nach oben vorgestelltem Ansatz im Falle einer Entzündungsreaktion unbeschädigt bleiben.

Von anderen Untersuchungen ist bereits bekannt, dass gelöstes Streptavidin, welches zuvor mit Biotin abgesättigt wurde, resistent gegenüber proteolytischem Verdau ist.⁽²⁴⁶⁾⁽²⁴⁷⁾ Dies war aber für einen Streptavidinmonolayer noch nicht bekannt. Einen Erklärungsansatz hierfür lieferten Gonzalez et al., die ebenfalls eine hohe Resistenz von Biotin-Streptavidin-Komplexen gegenüber thermischer Denaturierung beobachtet haben:⁽²⁴⁸⁾ Bindet Biotin an das Streptavidin, so führt dies zu einer strukturellen Konformationsänderung des Streptavidins. Hierbei entsteht eine sogenannte Kerneinheit („core-unit“) aus Biotin und Streptavidin, die extrem stabil ist.⁽²⁴⁹⁾ Dabei steigt die Entfaltungstemperatur von 75 °C für Streptavidin ohne Biotin auf 112 °C für Streptavidin mit Biotin. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint diese strukturelle Konformationsänderung auch eine Begründung für die hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischem Verdau zu bieten. Demnach sind die entsprechenden Bindungen im Streptavidin bei Bindung an das Biotin für die Proteasen nicht mehr zugänglich, und zwar sowohl in Lösung als auch als Monolayer gebunden auf einer Oberfläche.

4.3 Anbindung osteoinduktiver Wachstumsfaktoren

4.3.1 Simulation der Biotinylierung von BMP-2 und BMP-2/6

Um einen osteoinduktiven Wachstumsfaktor (BMP-2) auf einer Streptavidin-biofunktionalisierten Oberfläche zu immobilisieren, muss das Protein mit einer Biotingruppe versehen werden. Diese Biotingruppe darf nicht direkt am Protein lokalisiert sein, da sonst die Bindung in die Bindungstasche des Streptavidins nicht möglich ist. Hierfür wird ein „Spacer“ mit einer Mindestlänge von 0.8 nm benötigt.⁽²⁵⁰⁾

Zunächst wurde ein molekulargenetischer Ansatz zur Biotinylierung von BMP-2, der eine zielgenaue Einführung des Biotins ermöglicht, in Betracht gezogen. Dabei wird molekularbiologisch eine Biotinylierungssequenz eingefügt, die von einer Biotin-Ligase erkannt wird und spezifisch dort ein Biotin anfügt. Allerdings ist die Herstellung eines solchen rekombinanten Proteins mit erheblichem Aufwand verbunden. Die Herstellungsdauer beträgt oft mehrere Monate. Zudem ist vorher nicht abzuschätzen, welche Auswirkungen die veränderte Sequenz auf die Löslichkeit, Aufreinigung und biologische Aktivität hat. Eukaryontische Proteine weisen generell ein spezifisches Glykosylierungsmuster auf, welches nur durch rekombinante Herstellung in höheren eukaryontischen Systemen mit geringer Ausbeute hergestellt werden kann. Zudem erfordert die klinische Zulassung solcher veränderten Wachstumsfaktoren besondere Tests, die eine Anwendung auf Implantaten in weite Ferne rücken lassen. Da der molekulargenetische Ansatz des Einbaus einer Biotinylierungssequenz in den Wachstumsfaktor BMP-2 aufgrund der oben genannten Argumentationskette verworfen wurde, blieb die Möglichkeit, eine chemisch ungerichtete Biotinylierung an bestimmte Aminosäurereste durchzuführen.

Die Einführung einer Biotinylierung in ein Protein birgt immer das Risiko, dass ein strukturell oder katalytisch wichtiger Rest verändert wird, da die Biotinylierung ungerichtet erfolgt. Allerdings kann die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden, mit der ein Rest für eine Biotinylierung zugänglich ist. Dazu ist ein Kenntnis der Sequenz und der entsprechenden Struktur-Funktionsbeziehungen notwendig. BMP-2 besteht vor den posttranslationalen Modifikationen aus 396 Aminosäuren (AS). Davon bilden die AS 1 bis 23 ein Signalpeptid, die AS 24 bis 282 das Propeptid. Dies wird während einer posttranslationalen Modifikation abgespalten, sodass ein 114-AS-Polypeptid zurückbleibt, welches das biologisch aktive BMP-2 bildet.⁽²⁵¹⁾

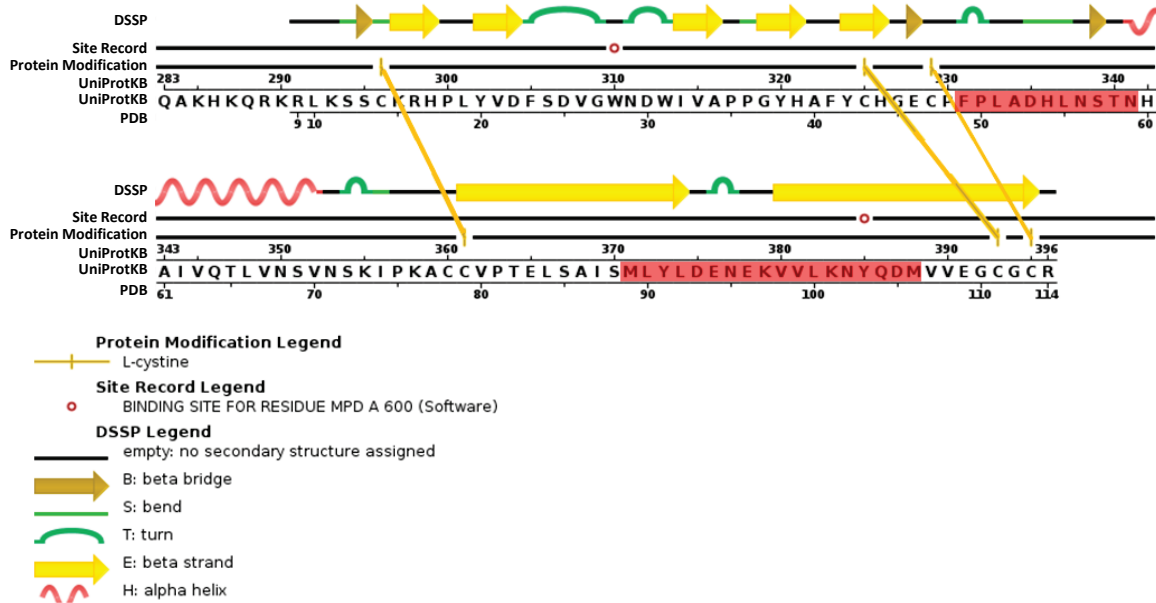


Abb. 4-19: Sequenz und Sekundärstrukturelemente von BMP-2. Die für die Rezeptorinteraktionen wichtigen Bereiche sind in der Sequenz rot unterlegt. Modifiziert nach dem PDB-Eintrag für 3BMP.⁽²⁵¹⁾

In dem 114 AS langen Peptid gibt es bestimmte Bereiche mit bedeutendem strukturellen oder funktionalen Charakter (Abb. 4-19). Dazu zählen insbesondere die Sequenzabschnitte 49 bis 59 und 89 bis 106, in denen sich einige Aminosäurereste für die Rezeptorbindung befinden.^{(252)(253),(254)} BMP-2 kann mit Typ-I-Rezeptoren (Bone Morphogenetic Protein Receptor (BMPR) IA und IB) interagieren. Darüber hinaus gibt es noch die Möglichkeit einer *low-affinity*-Bindung an Typ-II-Rezeptoren (BMPR-II-Rezeptoren), die zusammen mit der Bindung eines BMPR-I-Rezeptors massiv verstärkt wird und den sogenannten ternären Komplex bildet. Die Rezeptorbindestellen für Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren befinden sich dabei an verschiedenen Epitopen des BMP-2. Typ-I-Rezeptoren binden an das *wrist*-Epitop und Teile der *finger*-Domäne, Typ-II-Rezeptoren an das *knuckle*-Epitop.^{(255),(256)(251),(254)} Diese Epitope sind in Abb. 4-20 dargestellt.

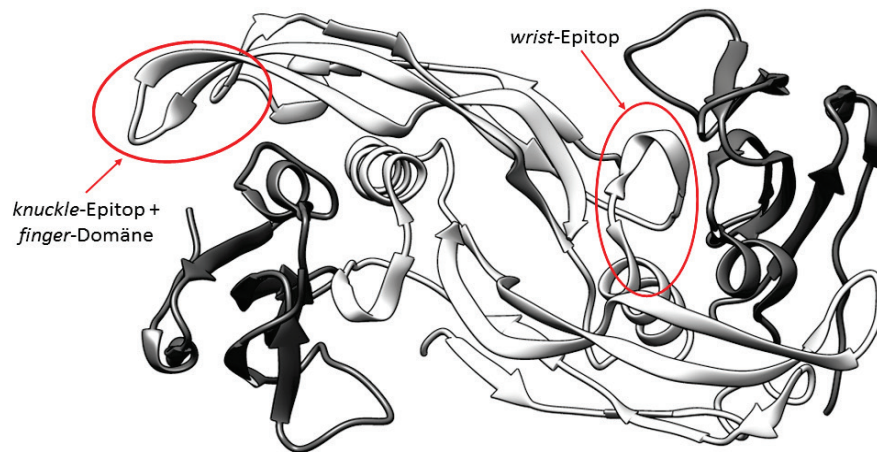


Abb. 4-20: BMP-2-Homodimer assembliert mit BMPR1A. Wichtig für die Interaktionen mit dem Rezeptor sind das knuckle-Epitop, die finger-Domäne und das wrist-Epitop. Modifiziert nach Kotzsch et al.⁽²⁵⁴⁾

Es wurde simuliert, welche Reste bei einer ungerichteten Biotinylierung mit größerer Wahrscheinlichkeit biotinyliert werden. Dazu wurden zur Auswahl eines geeigneten Biotinylierungsreagenz die Zugänglichkeit der entsprechenden Reste mittels der Software *NetSurfP* über die Berechnung der *relative surface accessibility* ermittelt.⁽¹⁶⁷⁾ Über *Chimera* wurden die einzelnen Reste visuell dargestellt und ihre Zugänglichkeit abgeschätzt. Diese Daten wurden mit den bekannten Struktur- und Funktionssequenzen im BMP-2 verglichen und bildeten die Basis für die Festlegung eines geeigneten Biotinylierungsreagenzes.

Für die chemische Biotinylierung standen vier Biotinylierungsreagenzien zur Verfügung. Die Biotinylierung mit einem Maleimid-Biotinylierungsreagenz greift an Thiolgruppen an. Im BMP-2 sind sieben Cysteine mit Thiolgruppen vorhanden (Abb. 4-21), die strukturell wichtige Disulfidbrücken bilden. Die Kopplung eines Biotins an eine der Thiolgruppen würde die Ausbildung der Disulfidbrücke verhindern, was eine Instabilität des Proteins zur Folge hätte.⁽²⁵⁷⁾ Aus diesem Grund ist die Biotinylierung an Thiolgruppen nicht weiter verfolgt worden.

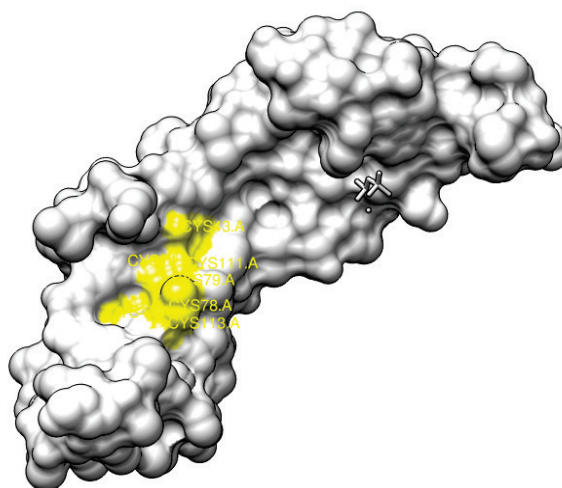


Abb. 4-21: Cysteingruppen (gelb) im BMP-2 Monomer. Die Cysteingruppen liegen nah beieinander und sind essentiell für die Disulfidbrückenbindung im Homodimer. Erstellt mit Chimera auf Grundlage des PDB-Eintrags für 3BMP.⁽²⁵¹⁾

Die Biotinylierung mit einem photoreaktiven Aryl-Azido-Rest an aromatischen Aminosäureresten ist im BMP-2 prinzipiell möglich. Jedoch liegen die entsprechenden Aminosäuren innerhalb der funktional entscheidenden Sequenz der Rezeptorbindestelle. Aus diesem Grund scheiden Biotinylierungsreagenzien, die an einem aromatischen AS-Rest angreifen, aus. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Biotinylierung von BMP an aromatischen Aminosäuren mit einem Verlust der biologischen Aktivität einhergeht.⁽²⁵⁸⁾

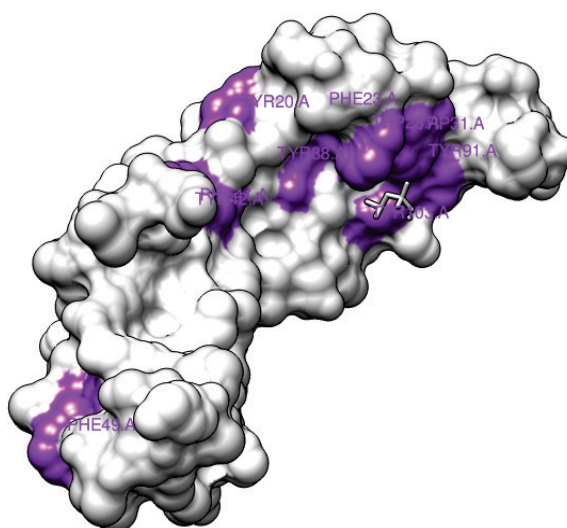


Abb. 4-22: Aromatische Reste (violett) im BMP-2 Monomer. Einige aromatische Gruppen sind essentiell für die Interaktion von BMP-2 mit den Rezeptoren (PHE₄₉, TRP₅₈, TYR₉₁, TYR₁₀₃). Erstellt mit Chimera auf Grundlage des PDB-Eintrags für 3BMP.⁽²⁵¹⁾

Die Biotinylierung von BMP-2 an Carboxylgruppen ist prinzipiell an Glutamat- (Glu) und Aspartatresten (Asp) möglich. Dabei wird EDC eingesetzt, welches Carboxylgruppen aktiviert. Durch Zugabe eines aminreaktiven Biotinylierungsreagenzes kann unter Bildung einer Peptidbindung ein Biotin an der aktivierten Gruppe eingeführt werden. Allerdings kommt es auch zu Quervernetzung zwischen den Proteinen, wodurch die biologische Aktivität verloren geht. Zudem liegen mit Asp_{53, 93, 105} und Glu_{94, 96} gleich fünf Aminosäurereste im BMP-2 innerhalb der Rezeptorbindestellen (Abb. 4-19; Abb. 4-24). Einige dieser Gruppen sind zudem auch exponiert, d. h. besonders gut für das Biotinylierungsreagenz zugänglich (Abb. 4-23). Diese wurden mit dem Programm *NetSurfP* ermittelt.⁽¹⁶⁷⁾ Hier ist die Wahrscheinlichkeit für eine Biotinylierung höher als bei den Gruppen, die nicht in der Rezeptorbindestelle liegen. Diese Gruppen kommen daher nicht für die Anbindung des Biotinderivates in Frage.

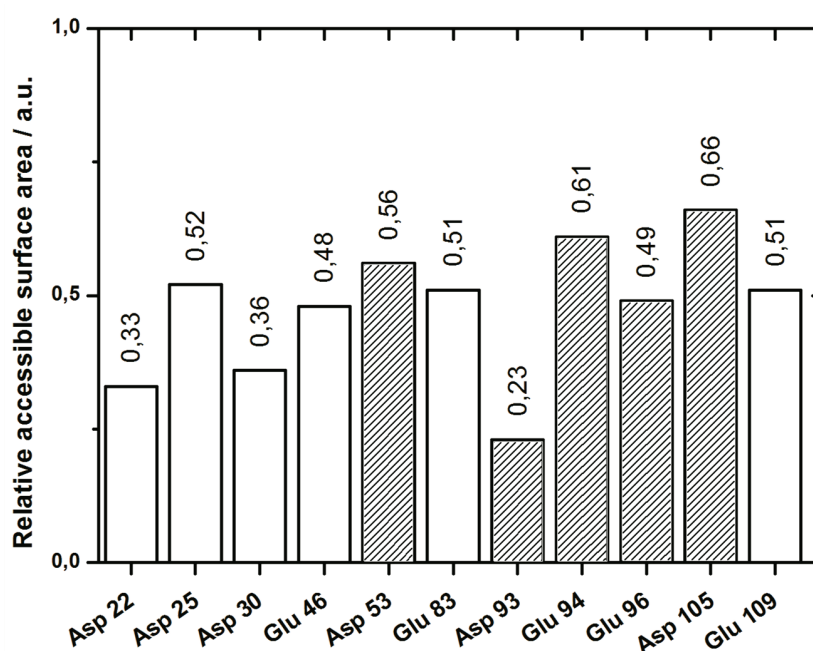


Abb. 4-23: RSA (Relative accessible surface area) der Aspartat(Asp)- und Glutamat(Glu)-Reste für Lösungsmittel im BMP-2. Die Grenze, ab wann ein Rest als exponiert eingestuft wird, liegt bei ca. 0.3. Die in der Rezeptorbindung involvierten Reste sind durch Schraffierung hervorgehoben und weisen die höchste Zugänglichkeit auf.

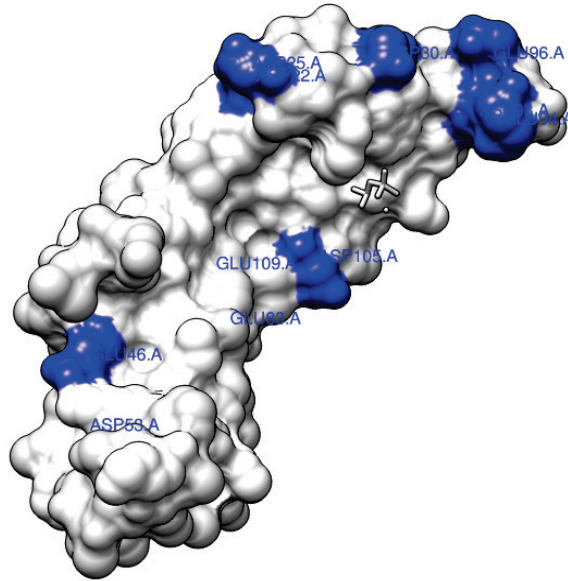


Abb. 4-24: Negativ geladene Reste (blau) im BMP-2 Monomer. Einige der negativen Aminosäurereste sind essentiell für die Interaktion von BMP-2 mit den Rezeptoren (Asp₅₃, 93, 105; Glu₉₄, 96). Erstellt mit Chimera auf Grundlage des PDB-Eintrags für 3BMP.⁽²⁵¹⁾

Aminreaktive Biotinylierungsreagenzien greifen nukleophil an primären Aminen an, wie sie in Lysinresten vorkommen. Das reife BMP-2 besitzt neun Lysinreste, die biotinyliert werden können. Aminogruppen sind am N-Terminus im BMP-2 akkumuliert, da hier eine Heparinbindestelle vorliegt.

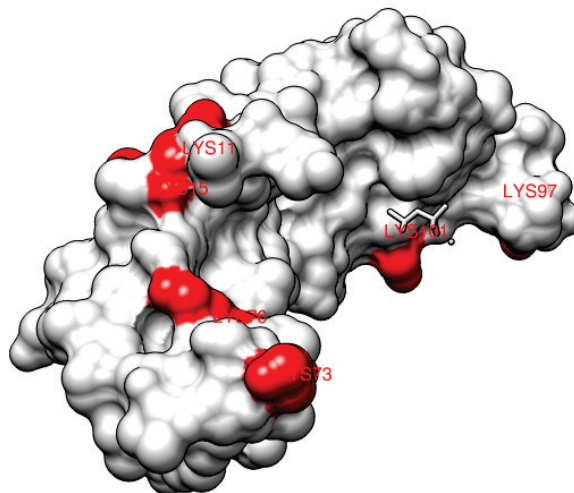


Abb. 4-25: Lysinreste (rot) im BMP-2 Monomer. Die Lysinreste Lys₁₅, 97, 101 liegen z. T. in der Rezeptorbindestelle oder sind an der Rezeptorbindung beteiligt. Erstellt mit Chimera auf Grundlage des PDB-Eintrags für 3BMP.⁽²⁵¹⁾

Die Heparinbindestelle ist für die biologische Aktivität des BMP-2 nicht notwendig.^{(50),(259)} Weitere Lysine liegen z. T. in der Rezeptorbindestelle, allerdings sind sie nicht alle essentiell an der Rezeptorbindung beteiligt.

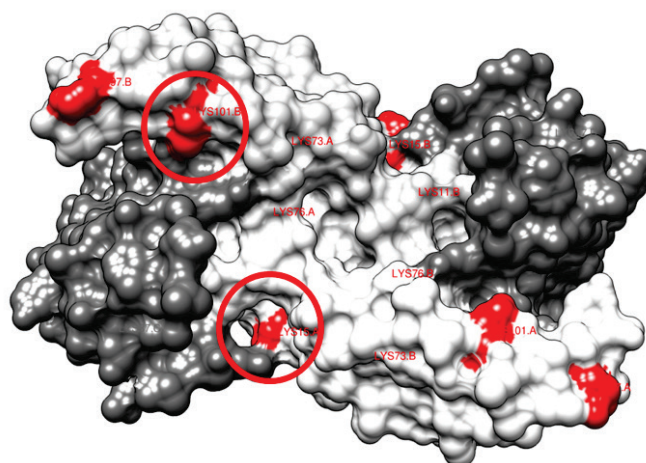


Abb. 4-26: Komplex eines BMP-2-Homodimers (weiß) mit BMPRI A (grau). Die Lysinreste im BMP-2 sind rot dargestellt. Rot eingekreist sind die mit dem BMPRI A interagierenden Lysinreste (Lys_{15,101}). Erstellt mit Chimera auf Basis der Daten von Kotzsch et al.⁽²⁵⁴⁾

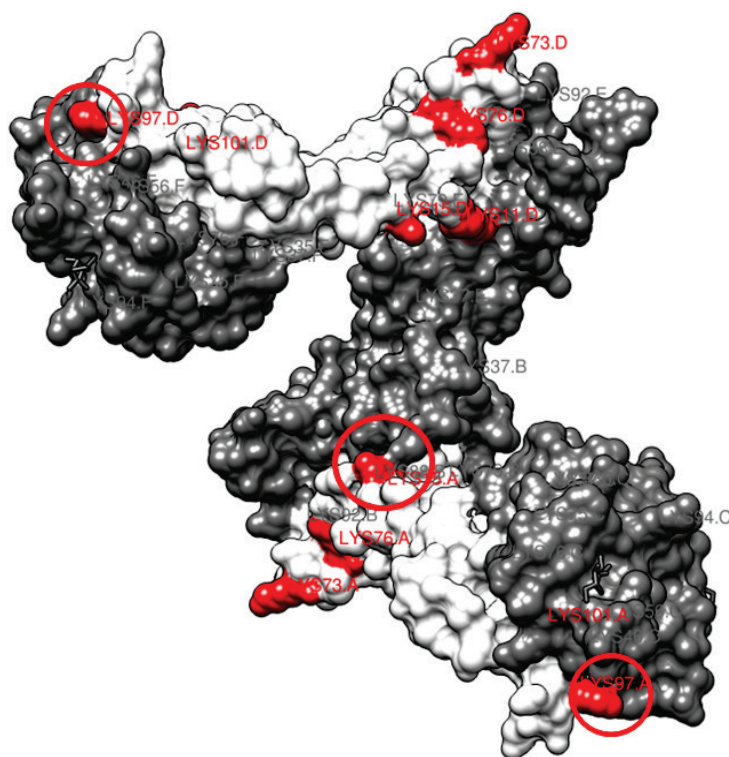


Abb. 4-27: Ternärer Komplex von BMP-2 (weiß) mit einem BMPRII-Rezeptor und zwei BMPRI-Rezeptoren (grau). Die Lysinreste im BMP-2 sind rot dargestellt, die mit den Rezeptoren in Interaktion stehenden Lysinreste (Lys_{97,101}) rot eingekreist. Erstellt mit Chimera auf Basis der Kristallstrukturdaten von Allendorph et al.⁽²⁵⁵⁾

Wie Abb. 4-26 und Abb. 4-27 zeigen, sind die Reste Lys_{15, 97, 101} in die Rezeptorbindung involviert. Aus den Abbildungen ist allerdings bereits ersichtlich, dass diese Reste nicht besonders gut zugänglich sind. Eine Abschätzung der Zugänglichkeit der Lysingruppen mit dem Programm *NetSurfP*⁽¹⁶⁷⁾ ergab eine erhöhte Wahrscheinlich-

keit für eine Funktionalisierung an einem Lysin, das nicht in der Nähe der Rezeptorbindestelle liegt (Abb. 4-25). Dabei zeigte sich die beste Zugänglichkeit für das Lösungsmittel und damit auch für das Biotinylierungsreagenz bei Aminosäureresten, die nicht in der Rezeptorbindung involviert waren (Abb. 4-28).

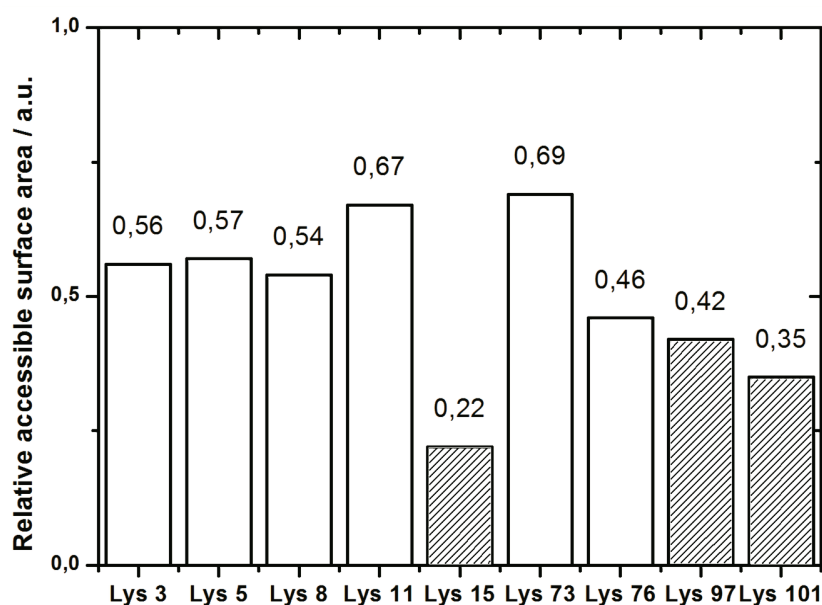


Abb. 4-28: RSA (Relative accessible surface area) der Lysinreste für Lösungsmittel im BMP-2. Die Grenze, ab wann ein Rest als exponiert eingestuft wird, liegt bei ca. 0.3. Die in der Rezeptorbindung involvierten Reste sind durch Schraffierung hervorgehoben und weisen die geringste Zugänglichkeit auf.

Dies deckt sich mit Untersuchungen von Sebald et al., die die *differential accessible surface area* der Aminosäurereste von BMP-2 untersuchten, die in die Rezeptorbindung mit involviert sind. Dabei zeigte sich, dass Lysin_{15, 97, 101} für Lösungsmittelmoleküle zu 80 % schlechter zugänglich, verglichen mit der Lösungsmittelzugänglichkeit des freien Restes in Lösung.⁽²⁵³⁾ Demnach ist eine Biotinylierung an diesen Positionen unwahrscheinlich.

Die Biotinylierung von BMP-2 an primären Aminogruppen erschien nach den Simulationsergebnissen als sicherste Variante, um die Bioaktivität des BMP-2 nicht einzuschränken. Alle anderen Biotinylierungsverfahren schieden aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung des BMP-2 aus.

Ähnlichkeit von BMP-2 und BMP-2/6

Um die Biotinylierung eines BMP-2/6-Heterodimers mit einem Biotinylierungsreagenz abzuschätzen, welches an primären Aminen angreift, wurden die Sequenz und die Zugänglichkeit der einzelnen Lysinreste analysiert. Da ein Heterodimer aus

je einem BMP-2- und einem BMP-6-Monomer besteht, kann über eine Analyse der Biotinylierungswahrscheinlichkeit von Lysinresten in den entsprechenden Homodimeren Rückschluss auf die Biotinylierungswahrscheinlichkeiten im Heterodimer gezogen werden. Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits eingehend die Wahrscheinlichkeit einer Biotinylierung von BMP-2 an den entsprechenden Lysinresten abgeschätzt. Für das BMP-6-Homodimer wurde ein Sequenzvergleich mit BMP-2 durchgeführt (Abb. 4-30) und die strukturell und funktionell wichtigen Bereiche ermittelt (Abb. 4-31).

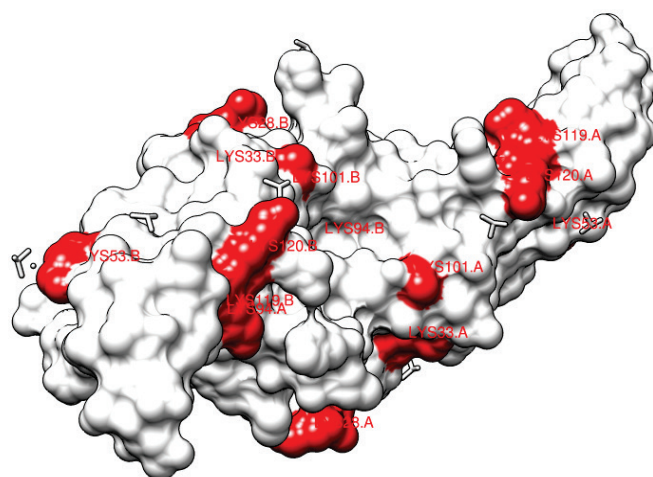


Abb. 4-29: BMP-6-Homodimer. Die Lysinreste (rot) sind bis auf Lyss_4 (entspricht in der Abb. Lys_{101}) nicht an der Rezeptorbindung beteiligt. Erstellt mit Chimera auf Grundlage des PDB-Eintrags für $2R52^{(166)}$

Der Sequenzvergleich⁽¹⁶⁸⁾ ergab, dass BMP-2 und BMP-6 etwa 57 % Sequenzidentität teilen (Abb. 4-30). Einige Lysinreste, die im BMP-2 vorkommen, sind strukturell und funktional identisch im BMP-6 (Lys_{11, 16, 77, 102}). BMP-6 besitzt zwei Lysinreste weniger, davon sind die Reste Lys_{36, 84, 103} im Vergleich zum BMP-2 neu. Aus Abb. 4-31 ist ersichtlich, dass diese Lysinreste in den bekannten Rezeptorinteraktionen keine Rolle spielen.

BMP-2 QAKHKQRKRLKSSCKRHPLVYDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECFPFLADHLNSTNH
:
BMP-6 SASDYNSELKTACRKHELYVSFQDLGWQDWIIPKGYAANYCDGECSFPLNAHMNATNH

BMP-2 AIVQTLVNSVNSK-IPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVLKNYQDMVVEGCGC
:
BMP-6 AIVQTLVHLMNPYYVKPCCAPTKLNAISVLYFDDNSNVILKKYRNMVVVRACGC

Abb. 4-30: Sequenz-Alignment von BMP-2 und BMP-6. BMP-6 besitzt drei weitere Lysinreste, die an anderen Positionen als im BMP-2 vorkommen (Lys₃₆, ₈₄, ₁₀₂). Insgesamt besitzt BMP-6 sieben Lysine, BMP-2 dagegen neun.

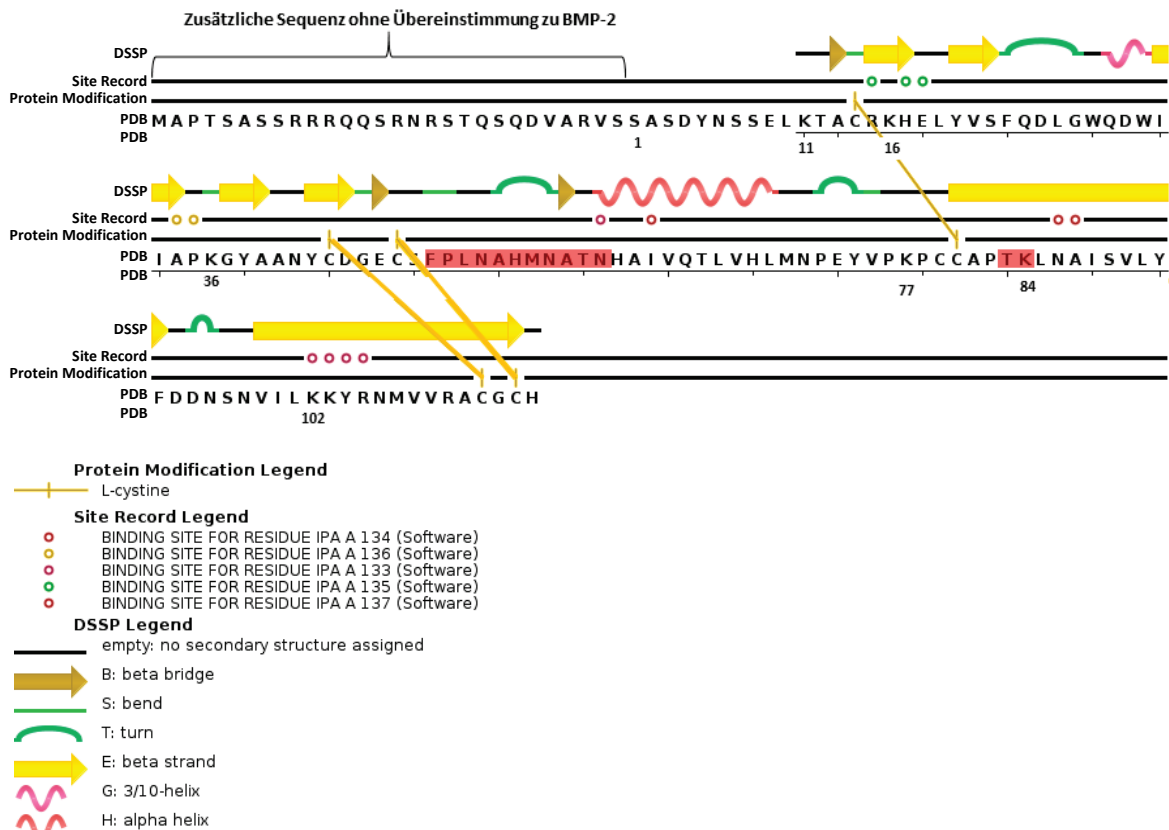


Abb. 4-31: Sequenz und Sekundärstrukturelemente von BMP-6. Die Zählung der Aminosäurereste ist an das Sequenz-Alignment mit BMP-2 angepasst, d. h. die Zählung beginnt ab der größten Übereinstimmung mit BMP-2. Dies vereinfacht den Vergleich mit BMP-2. Die für die Rezeptorinteraktionen wichtigen Bereiche sind in der Sequenz rot unterlegt. Modifiziert nach dem PDB-Eintrag für 2R52.⁽¹⁶⁶⁾

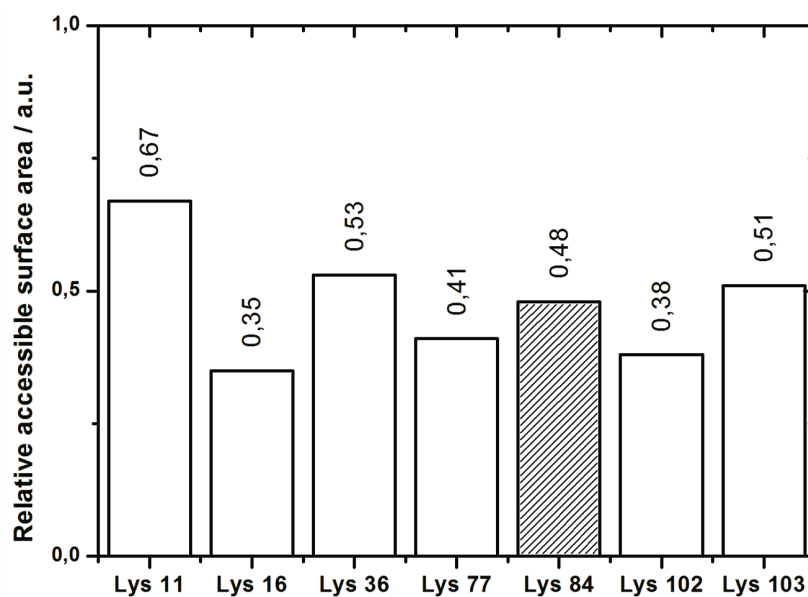


Abb. 4-32: RSA (Relative accessible surface area) der Lysinreste für Lösungsmittel im BMP-6. Die Grenze, ab wann ein Rest als exponiert eingestuft wird, liegt bei ca. 0.3. Der in der Rezeptorbindung teilweise involvierte Rest ist schraffiert dargestellt.

Die Rezeptorbindung von BMP-6 an die Typ-I-Rezeptoren ist vergleichbar mit der Rezeptorbindung im BMP-2. Auch im BMP-6 gibt es eine *finger*-Domäne, die in der Rezeptorbindung wichtig ist. Hierfür sind die Aminosäurereste Phe₆₆-N₇₆ relevant.⁽¹⁶⁶⁾ Innerhalb dieser Sequenz befindet sich kein Lysinrest, der die Rezeptorbindung durch eine Biotinylierung beeinträchtigen könnte. Die Bindung von BMP-6 an Act-Rezeptoren ist stärker als im BMP-2 und für die biologische Aktivität bedeutend. Es ist mittlerweile bekannt, dass dazu eine Glykosylierung am Asn₇₃ erforderlich ist.⁽¹⁶⁶⁾ Dieser Zuckerrest wird wahrscheinlich durch Interaktion mit Lys₈₄ vom BMP-6 stabilisiert, weshalb dieser Lysinrest möglichst unverändert bleiben sollte.

Die Zugänglichkeit für Lösungsmittelmoleküle und damit auch vom Biotinylierungsreagenz an die Lysinresten von BMP-6 wurde mittels der Software *NetSurfP* abgeschätzt. Hierbei zeigte sich, dass es im BMP-6 andere Lysinreste gibt (Lys_{11, 36, 103}), die leichter zugänglich sind als Lys₈₄ und daher mit einer größeren Wahrscheinlichkeit biotinyliert werden (Abb. 4-32).

Für ein BMP-2/6-Heterodimer kann aus diesen Analysen geschlossen werden, dass eine Biotinylierung bevorzugt N-terminal an der Heparinbindestelle von BMP-2 stattfindet, oder an Lysinresten, die weder im BMP-2 noch im BMP-6 eine essentielle Bedeutung in der Rezeptorbindung haben.

4.3.2 Analyse der Biotinylierung

Nachweis der Biotinylierung

Der qualitative Nachweis der Biotinylierung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Abb. 4-33 zeigt, dass BMP-2 und biotinyliertes BMP-2 (bBMP-2) eine Bande bei ca. 26 kDa ergeben. Die folgende Detektion im Western Blot mittels Streptavidin-HRP zeigte nur eine Bande für das biotinylierte Biotin. Streptavidin-HRP kann nur an die ans BMP-2 konjugierten Biotingruppen binden und das chemilumineszenzaktive Substrat für die HRP umsetzen.

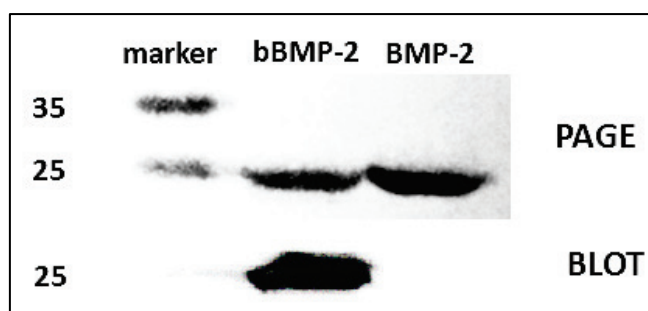


Abb. 4-33: SDS-PAGE von BMP-2 und bBMP-2 mit anschließender Detektion von bBMP-2 durch Streptavidin-HRP im Western Blot. Dort zeigte sich nur eine Bande für das biotinylierte BMP-2.

Die Detektion nach dem Western Blot ergab lediglich einen qualitativen Nachweis der Biotinylierung. Um die Anzahl der Biotine pro BMP-Molekül zu ermitteln, wurde ein HABA-Assay durchgeführt. Dieser beruht auf einer Verdrängungsreaktion des Biotinanalogs HABA (4'-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure) durch Biotin. Dies ist möglich, da Biotin, selbst wenn es an Proteine konjugiert ist, eine deutlich höhere Affinität für Streptavidin besitzt. Das Streptavidin ist Fluoreszenzgekoppelt; HABA wirkt als Quencher, solange es in den Bindungstaschen von Streptavidin gebunden ist. Wird HABA durch Biotin verdrängt, so wird der Quenchingprozess proportional zur gebundenen Biotinmenge aufgehoben; die Fluoreszenz kann nun detektiert werden. BMP-2 wurde in verschiedenen molaren Biotinüberschüssen inkubiert (1:2, 1:5, 1:10) und der DOL (*Degree of Labelling*) nach Kalibrierung anhand einer Biocytin-Standardreihe ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 dargestellt.

Tabelle 4-2: Biotinylierungsgrad von biotinyliertem BMP-2.

| <i>Biotinüberschuss (n[BMP:Biotin])</i> | DOL |
|--|-------------|
| 1:0 | 0.2±0.1 |
| 1:2 | 0.96 ± 0.23 |
| 1:5 | 0.98 ± 0.02 |
| 1:10 | 1.5 ± 0.35 |

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass das fluoreszenzmarkierte Streptavidin möglicherweise nie vollständig mit HABA abgesättigt werden kann, da auch ohne Biotin eine geringe Eigenfluoreszenz sichtbar ist. Der bei einem molaren Biotinüberschuss von 0 gemessene fiktive DOL ist gleichbedeutend mit der Auflösungsgrenze der Methode. Der Biotinylierungsgrad ist für alle eingesetzten

Biotinüberschüsse < 2 . Dies ist bedeutend, da so ausgeschlossen werden kann, dass alle Lysingruppen im BMP-2 biotinyliert wurden. Wie im vorhergehenden Abschnitt 4.3.1 dargelegt, sind bestimmte Lysinreste im BMP-2 für die Bindung an verschiedene Rezeptoren von Bedeutung (Lys_{15, 97, 101}). Auch wenn diese Gruppen nicht exponiert vorliegen, kann mit dem hier durchgeführten HABA-Assay nicht ausgeschlossen werden, dass diese Lysinreste biotinyliert vorliegen. Dafür ist ein massenspektrometrischer Nachweis erforderlich, bei dem das biotinylierte BMP-2 vorher in kleine Fragmente verdaut wird.

Die Ergebnisse zeigen zudem, dass für einen molaren Überschuss von 1:2 oder 1:5 vergleichbare Biotinylierungsgrade erhalten werden. Diese liegen um 1 Biotin/Protein, wobei aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden kann, dass die gesamte Population an BMP-2 einen DOL von 1 aufweist. Theoretisch wäre es denkbar, dass auch 50 % der BMP-2-Moleküle einen DOL von 2 aufweisen und die anderen 50 % einen DOL von 0. Da für die Berechnung des DOL die ermittelte Stoffmenge an Biotin durch die Stoffmenge des eingesetzten Proteins geteilt wird, wird mit diesem Assay nur ein gemittelter Wert dargestellt. Dies kann aber auch in einer massenspektrometrischen Analyse validiert werden. Zudem ist es möglich, dass in einem HABA-Assay der tatsächliche DOL unterschätzt wird, da aus sterischen Gründen möglicherweise nicht alle konjugierten Biotingruppen am Protein in die Bindungstasche des Streptavidins passen. Dies kann besonders dann der Fall sein, wenn die biotinylierten Gruppen sterisch schwer zugänglich sind oder sehr nah beieinanderliegen.⁽²⁶⁰⁾ Dies ist für die meisten Lysinseitenketten im BMP-2 aber nicht der Fall. Für Lysinreste, die vergraben sind, würde ebenfalls eine massenspektrometrische Analyse Klarheit in diese Fragestellung bringen.

Massenspektrometrie

Um die Position des Biotins im bBMP-2 genau zu lokalisieren und damit eine Aussage über die Bindung an mögliche funktional wichtige Reste zu treffen, wurden das biotinylierte BMP-2 und natives BMP-2 tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Die Verdauprodukte konnten theoretisch mit der Software *PeptideCutter* ermittelt werden,⁽²⁶¹⁾ da die Schnittstellen von Trypsin bekannt sind (nach Lysin und Arginin). Abb. 4-34 zeigt die theoretisch möglichen Schnittstellen.

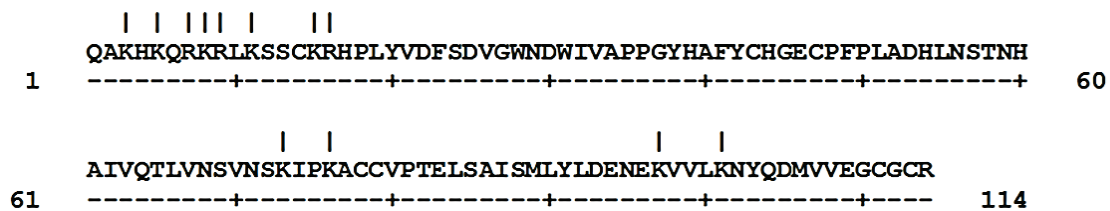


Abb. 4-34: Potentielle Schnittstellen von Trypsin innerhalb der Sequenz von BMP-2 (Uniprot-Sequenz: U3N491) sind mit einem senkrechten Strich gekennzeichnet. Die untere Zeile gibt die Position des Restes an.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie sind in Abb. 4-35 dargestellt. Hierbei sind die theoretischen Fragmente mit ihrem Molekulargewicht sowohl von BMP-2 als auch bBMP-2 aufgetragen. Zwei Fragmente (HKQR und KR) im bBMP-2 konnten identifiziert werden, sie wiesen ein exakt um die Masse des konjugierten Biotin-derivates (340.45 Da) verschobenes Molekulargewicht auf.

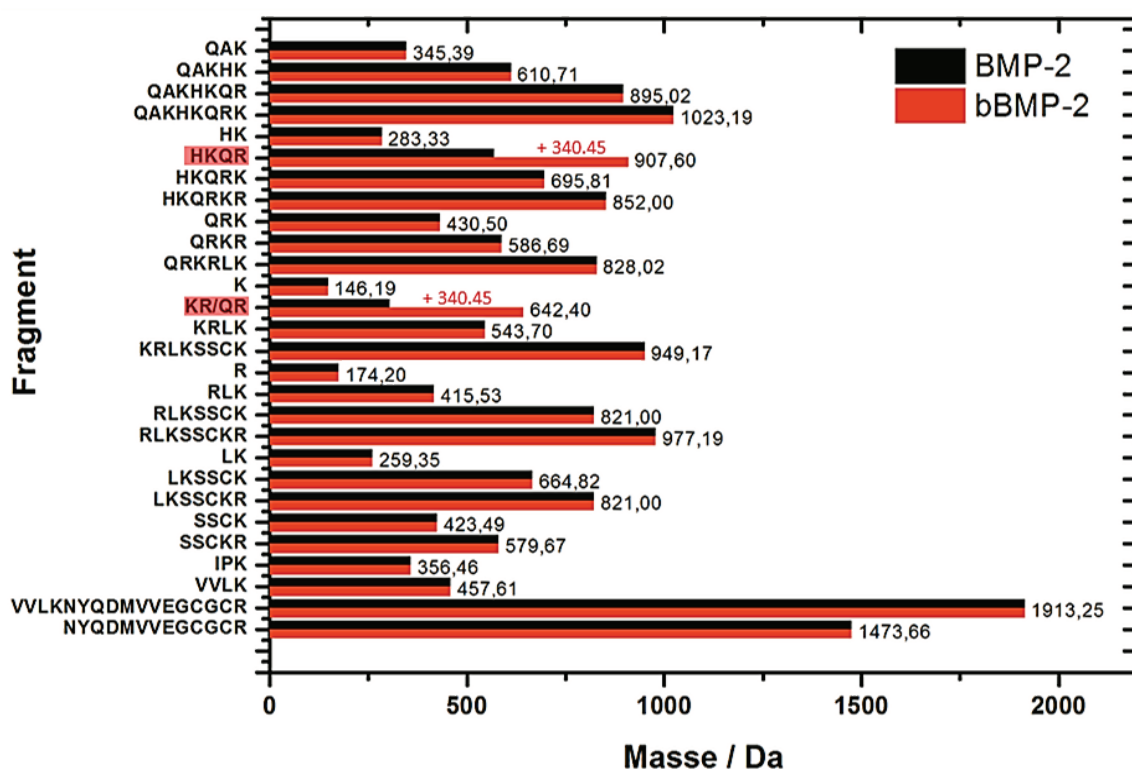


Abb. 4-35: Theoretische Verdaufragmente von BMP-2 und bBMP-2, aufgetragen gegen das entsprechende Molekulargewicht. Für die Fragmente HKQR und KR/QR (rot markiert) wurde im biotinylierten BMP-2 eine Verschiebung der Masse um 340.45 Da festgestellt.

Dieses Ergebnis ist ein starker Beleg dafür, dass die Biotinylierung im N-Terminus stattgefunden haben muss. Die Position der Fragmente innerhalb der Sequenz ist in Abb. 4-36 dargestellt. Daraus lässt sich ableiten, dass sowohl Lysinrest 5 als auch Lysinrest 8 biotinyliert werden können. Diese Reste haben sich in der Simulation

bereits als potentielle Kandidaten für eine Biotinylierung herausgestellt, da sie exponierter liegen als z. B. die Lysinreste, die in die Rezeptorbindung involviert sind. Sie liegen im N-Terminus, der nicht in die Rezeptorbindung involviert ist.⁽²⁵⁹⁾

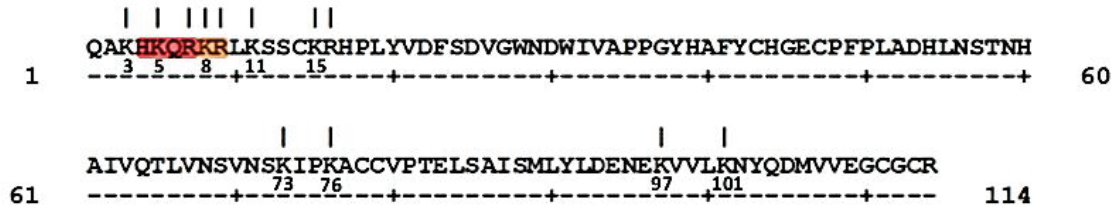


Abb. 4-36: Potentielle Schnittstellen von Trypsin innerhalb der Sequenz von BMP-2 (Uniprot-Sequenz: U3N491) sind mit einem senkrechten Strich gekennzeichnet. Die untere Zeile gibt die Position des Restes an. In rot und orange unterlegt sind die beiden Fragmente im biotinylierten BMP-2, die eine Masseverschiebung um 340.45 Da aufwiesen.

In den Fragmenten ist zudem nicht nach einem Lysin gespalten worden. Dies spricht zusätzlich dafür, dass diese Fragmente am Lysin biotinyliert vorliegen, weil dadurch die Proteaseschnittstelle blockiert ist. Dies wurde für einen tryptischen Verdau von biotinyliertem Lysozym ebenfalls beschrieben.⁽²⁶²⁾ Hierbei konnte Trypsin nicht am Lysin/Arginin spalten, wenn dieses modifiziert vorlag.

Es ließen sich keine weiteren biotinylierten Fragmente nachweisen, weder im positiven noch im negativen Ionenmodus. Die biotinylierten Fragmente mit Lysin oder Arginin ließen sich durch die vorhandenen Stickstoffatome besser positiv ionisieren und damit auch detektieren als andere Fragmente. Daher ist es unwahrscheinlich, dass weitere biotinylierte Fragmente nicht detektiert wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Biotinylierung nur an Lys₅ oder Lys₈ stattfindet. Eine weitere MS-Untersuchung des unverdauten Proteins ergab zudem, dass das biotinylierte BMP-2 eine um ca. 0.5 kDa höhere Masse aufwies als das native BMP-2 (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt ebenfalls, dass BMP-2 monobiotinyliert vorliegt, was auch durch die Ergebnisse des DOL nahegelegt wurde.

4.3.3 Immobilisierung von bBMP-2 und bBMP-2/6 auf das molekulare Schichtsystem

BMP-2 und BMP-2/6 wurden entsprechend Abschnitt 3.3.1 biotinyliert und aufgereinigt. Das molekulare Schichtsystem wurde bis Streptavidin aufgebracht. In einer Echtzeitmessung wurde die Adsorption verschiedener molarer Biotin:BMP-2 Überschüsse in einer Konzentration von 250 nM entsprechend Abb. 3-5 getestet.

Dabei stellte sich heraus, dass bBMP-2 aus einer Inkubation von BMP-2 mit dem zweifachen molaren Biotinüberschuss am besten auf die Oberfläche adsorbierte. Weitere bBMP-2-Varianten (1:5, 1:10; Protein:Biotin) zeigten ein schlechteres Adsorptionsverhalten auf einer Streptavidin-biofunktionalisierten TiO_x -Modelloberfläche. Natives BMP-2 konnte nicht auf die Streptavidinoberfläche gebunden werden. Berechnung der adsorbierten Schichtdicke mit der Software *Winspall* ergaben die in Tabelle 4-3 angegebenen Schichtdicken und Bedeckungsgrade.

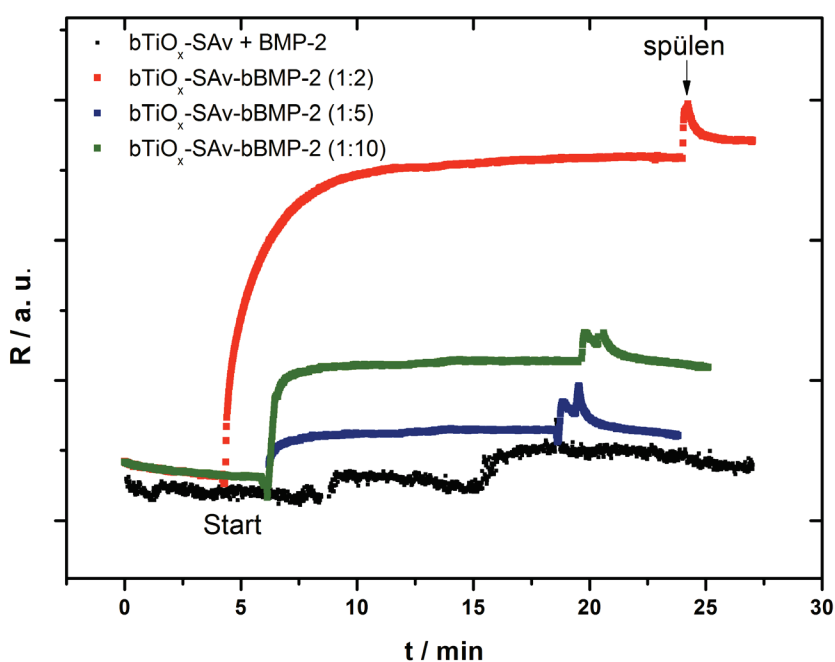


Abb. 4-37: Bindungskinetiken von bBMP-2-Varianten, die durch Inkubation mit verschiedenen molaren Biotinüberschüssen hergestellt wurden (1:2, 1:5, 1:10, Protein:Biotin). Biotinyliertes BMP-2 aus einem 1:2 Biotinüberschuss bindet am besten an das Schichtsystem. Die Bindung von nicht-biotinyliertem BMP-2 an das molekulare Schichtsystem wird unterdrückt.

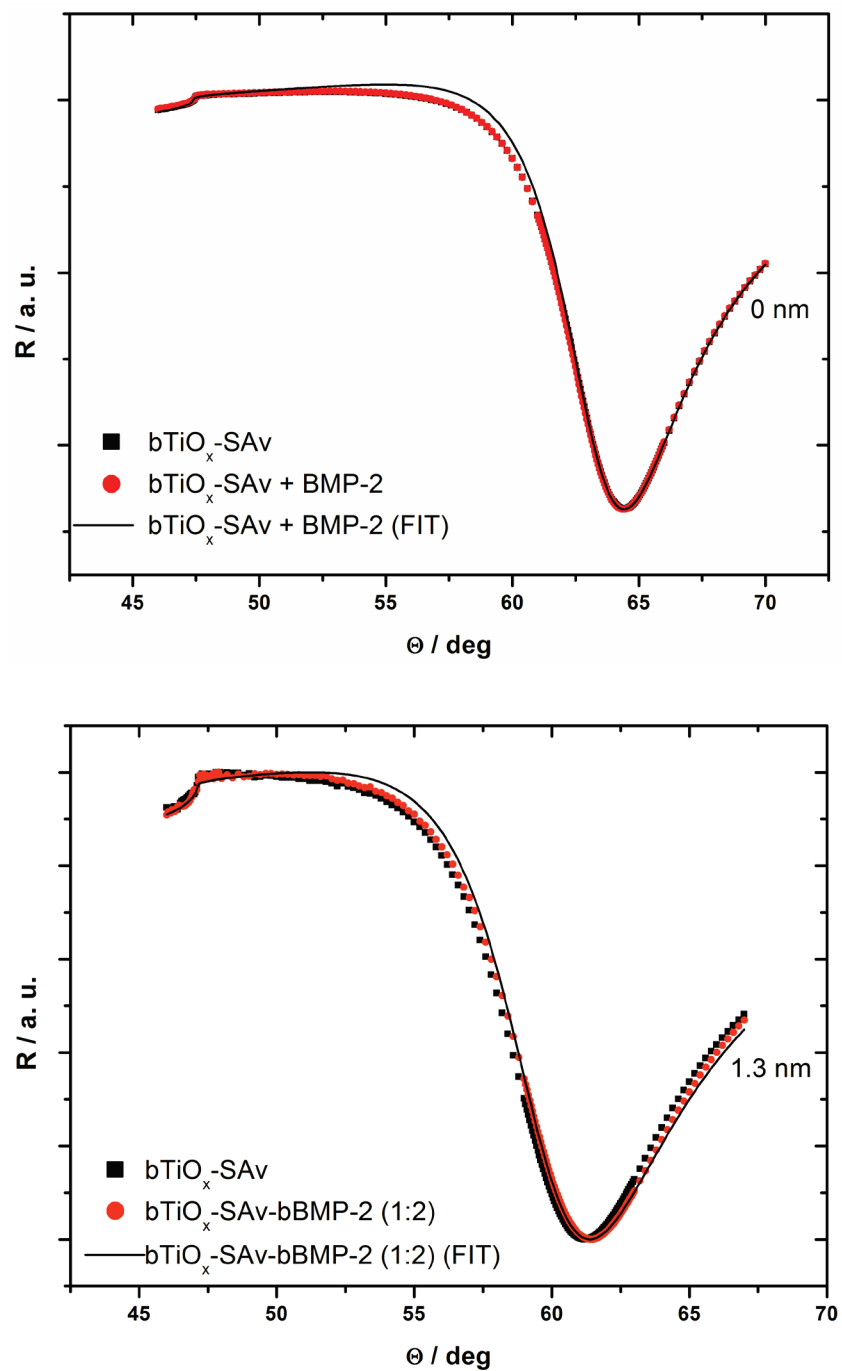


Abb. 4-38: Beschriftung siehe nächste Seite.

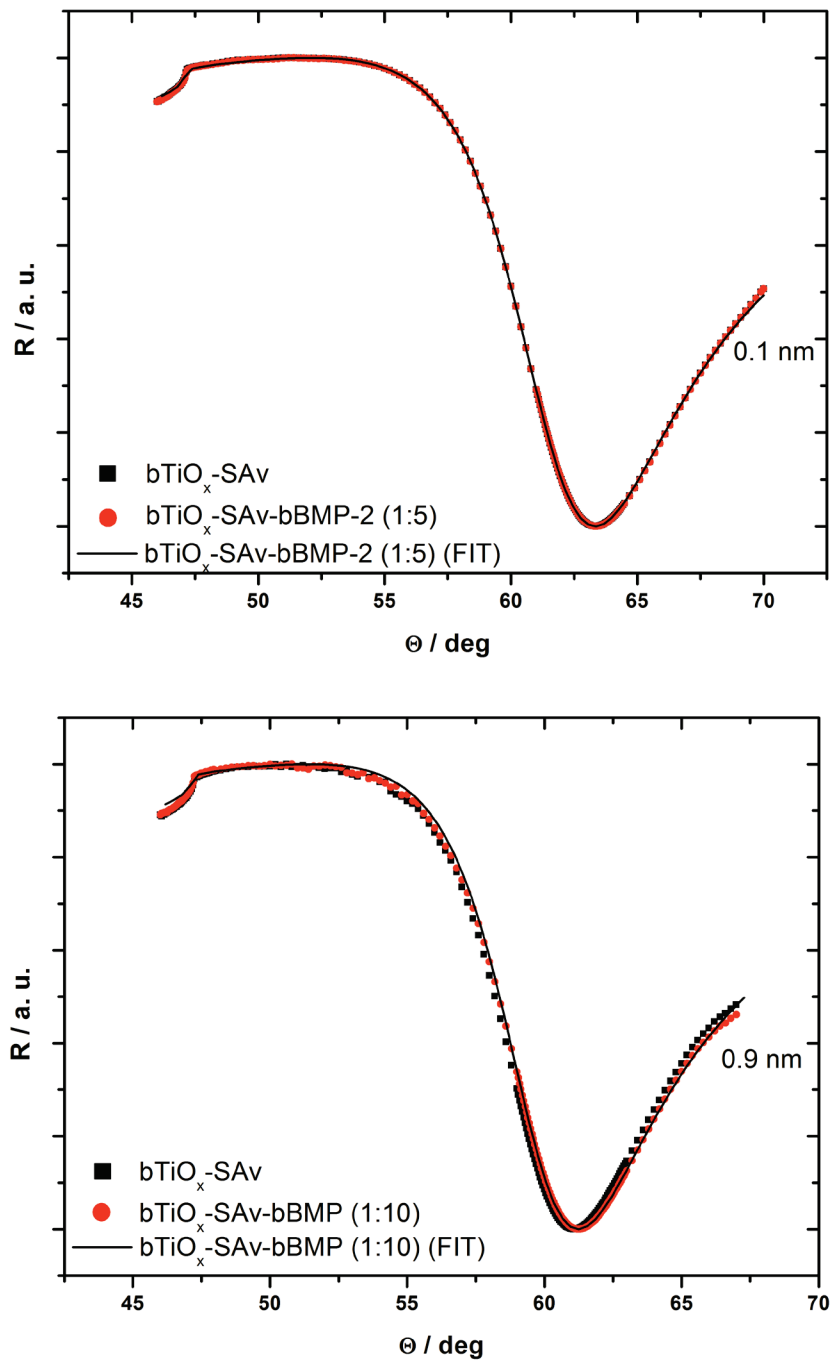


Abb. 4-38: Repräsentative SPR-Scans der Immobilisation von *bBMP-2* Varianten auf einem Streptavidinmonolayer, die durch verschiedene molare Biotinüberschüsse hergestellt wurden (1:2, 1:5, 1:10, Protein:Biotin). Biotinyliertes BMP-2 aus einem 1:2 Biotinüberschuss bindet am besten an das Schichtsystem. Die Bindung von nicht-biotinyliertem BMP-2 an das molekulare Schichtsystem wird unterdrückt.

BMP-2 besitzt eine Größe von $7 \times 3.5 \times 3.5 \text{ nm}^3$.⁽¹⁶⁵⁾ Demzufolge beträgt die Monolayerschichtdicke von BMP-2 3.5 nm und die Fläche $24,5 \text{ nm}^2$. Der Bedeckungsgrad Θ lässt sich wie folgt berechnen:

$$\Theta = \frac{\text{Zahl der adsorbierten Moleküle}}{\text{Anzahl der Adsorptionsplätze}} \quad (\text{Gl. 4-1})$$

Da in der SPR-Spektroskopie Schichtdicken adsorbierter Moleküle gemessen werden, kann der Bedeckungsgrad auch wie folgt ausgedrückt werden:

$$\Theta_{\text{SPR}} = \frac{\text{Schichtdicke}}{\text{Monolagendicke}_{\text{max}}} \cdot 100[\%] \quad (\text{Gl. 4-2})$$

Die Oberflächendichte (SD, *surface density*) ergibt sich aus

$$SD = \frac{\Theta}{100} \cdot \frac{N}{N_A} \cdot M \quad (\text{Gl. 4-3})$$

mit dem Molekulargewicht M , der Avogadro-Konstante N_A und der Teilchenzahl N pro cm^2 . Für den maximal möglichen Bedeckungsgrad von bBMP-2 auf einer Streptavidinschicht muss allerdings der Bedeckungsgrad der Streptavidinschicht mit eingerechnet werden. Streptavidin besitzt Dimensionen von $5.4 \times 5.8 \times 4.8 \text{ nm}$ (L x B x H) und damit eine Fläche von ca. 32 nm^2 .⁽¹⁹⁶⁾ Streptavidin besitzt vier Bindungstaschen für Biotin, wovon jeweils zwei auf einer Seite liegen. Aus sterischen Gründen kann auf einem Streptavidinmonolayer nur ein biotinyliertes BMP-2 mit einer Fläche von je 24.5 nm^2 pro Streptavidin binden. Dies verringert den maximal möglichen Bedeckungsgrad erheblich. Nimmt man einen mittleren Bedeckungsgrad Θ von 81 % für Streptavidin an, so entspricht dies einer Anzahl von $3.125 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$ Streptavidinmolekülen. Diese Zahl ist gleichbedeutend mit der Anzahl maximal zur Verfügung stehender Bindungsplätze für bBMP-2. Daraus ergibt sich eine maximale Oberflächendichte von 135 ng cm^{-2} . Wäre die Anzahl der Bindungsplätze für bBMP-2 nicht durch die Streptavidinmoleküle begrenzt, so würde die maximale Oberflächendichte 205 ng cm^{-2} betragen. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse aus Tabelle 4-3 zu beachten.

Tabelle 4-3: Schichtdicke, Bedeckungsgrad und Oberflächendichte von biotinyliertem BMP-2 auf Streptavidin. Der bei der Biotinylierung von BMP-2 eingesetzte Biotinüberschuss (Protein:Biotin) ist jeweils in Klammern angegeben.

| <i>Protein</i> | Schichtdicke [nm] | Bedeckungsgrad Θ [%] | Oberflächendichte des Proteins [ng cm⁻²] |
|----------------------|------------------------------|---|--|
| <i>Streptavidin</i> | 3.9 ± 0.4 | 81 ± 9 | 258±27 |
| <i>BMP-2</i> | 0 | 0 | 0 |
| <i>bBMP-2 (1:2)</i> | 1±0.4 | 29±12 | 39.2±16.2 |
| <i>bBMP-2 (1:5)</i> | 0.3±0.2 | 9±5 | 12.1±6.9 |
| <i>bBMP-2 (1:10)</i> | 0.5±0.4 | 14.3±11 | 19.3±14.9 |

Die vergleichsweise bessere Bindung der mit zweifachem Biotinüberschuss hergestellten bBMP-2-Variante gegenüber der 1:5- und 1:10-bBMP-2-Variante erscheint widersprüchlich. Die anderen bBMP-2-Varianten besitzen nach den Ergebnissen des DOL gleich viele (1:5) oder sogar mehr (1:10) Biotingruppen. Die Bindungsaffinität von biotinylierten Proteinen an einen Streptavidinmonolayer ist zwar deutlich geringer als in Lösung ($K_{A, \text{Lösung}} = 10^{15} \text{ M}^{-1}$; $K_{A, \text{Monolayer}} = 10^6 \text{ M}^{-1}$)⁽¹⁶⁾, jedoch steigt mit zunehmender Biotinmenge am Protein die Wahrscheinlichkeit für eine Bindung an den Streptavidinmonolayer. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nun genau den umgekehrten Fall. Für die bBMP-2-Variante, die mit zweifachem Biotinüberschuss hergestellt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Biotingruppe am N-Terminus lokalisiert ist. Für die 1:5- und 1:10-bBMP-2-Varianten wurde das nicht detailliert nachgewiesen. Daher besteht die Möglichkeit, dass zumindest in der 1:10-bBMP-2-Variante das weitere Biotin an ein anderes Lysin gebunden hat, welches für eine Bindung an das Streptavidin sterisch ungünstig liegt. Aus den FTIR-Untersuchungen zur Sekundärstruktur ist erkennbar, dass bei der 1:10-bBMP-2-Variante Sekundärstrukturänderungen auftreten. So nimmt der Anteil an α -Helix und β -Faltblatt-Strukturen ab, gleichzeitig steigt der Anteil an ungeordneten Strukturen (Abb. 4-39).

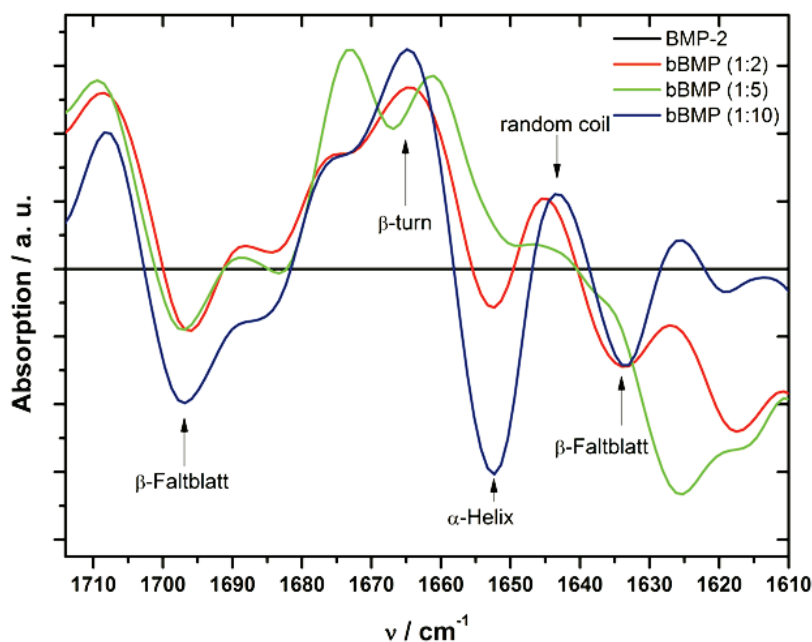


Abb. 4-39: IR-Differenzspektren der bBMP-2-Varianten, die mit verschiedenen Biotinüberschüssen hergestellt wurden (1:2 – 1:10, Protein:Biotin) im Vergleich zum unbehandelten Wachstumsfaktor. Die Änderungen in der Sekundärstruktur bei bBMP-2 (1:10) sind am ausgeprägtesten.

Im BMP-2 dominieren β -Faltblätter die Sekundärstruktur. In diesen Sekundärelementen liegen auch Lysinreste (Lys₁₅, 97, 101), die durch eine Biotinylierung möglicherweise die korrekte Faltung des β -Faltblatts behindern (Abb. 4-40).

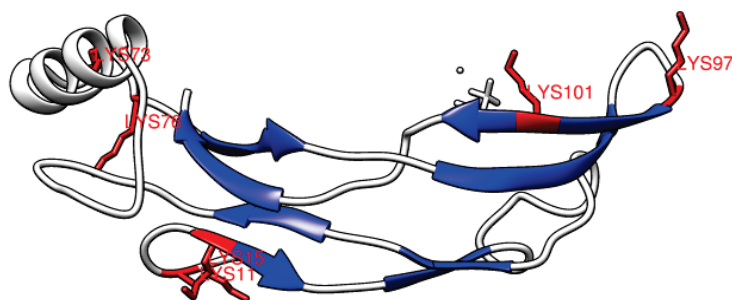


Abb. 4-40: Sekundärstruktur von BMP-2. Die β -Faltblattstrukturen sind blau dargestellt. Die Lysingruppen sind rot hervorgehoben. Zwei bis drei Lysinreste (Lys₁₅, 97, 101) liegen innerhalb einer β -Faltblattstruktur.

Zusätzliche Biotingruppen könnten möglicherweise die korrekte Faltung des Proteins stören und die Anbindung an den Streptavidinmonolayer ungünstig beeinflussen. Da aber die Sekundärelemente wie β -Faltblätter an der Rezeptorinteraktion beteiligt sind, wurde die 1:10-bBMP-2-Variante aufgrund der beobachteten Veränderung im β -Faltblattanteil in allen weiteren Versuchen nicht verwendet.

Wenn die zusätzliche Biotingruppe ebenfalls im N-Terminus liegt, so besteht auch die Möglichkeit, dass sich die beiden Biotingruppen sterisch behindern und so eine effektivere Bindung als bei der 1:2-bBMP-2-Variante verhindern. Dies ist aber aus den ermittelten Ergebnissen nicht ableitbar und kann daher auch nur unter bestimmten, nicht weiter nachprüfbaren Annahmen diskutiert werden. Folglich wurden die 1:5- und 1:10-bBMP-2-Varianten nicht für weitere Untersuchungen verwendet, sondern ausschließlich die 1:2-bBMP-Variante. Dieser molare 1:2-Biotinüberschuss wurde dann auch für die Biotinylierung und Immobilisation des bBMP-2/6-Heterodimers verwendet (Abb. 4-41). Die Adsorption des Heterodimers war ebenso spezifisch und resultierte in einem Bedeckungsgrad von 57 %. BMP-2/6 ist etwas größer als BMP-2. Aufgrund der Ähnlichkeit zum BMP-2 kann man für das Heterodimer eine Fläche von 25 nm² annehmen. Das Molekulargewicht beträgt 27.8 kDa, daraus ergibt sich eine maximale Oberflächendichte von 185 ng cm⁻². Mit dem Bedeckungsgrad erhält man dann eine Belegung von 105 ng cm⁻².

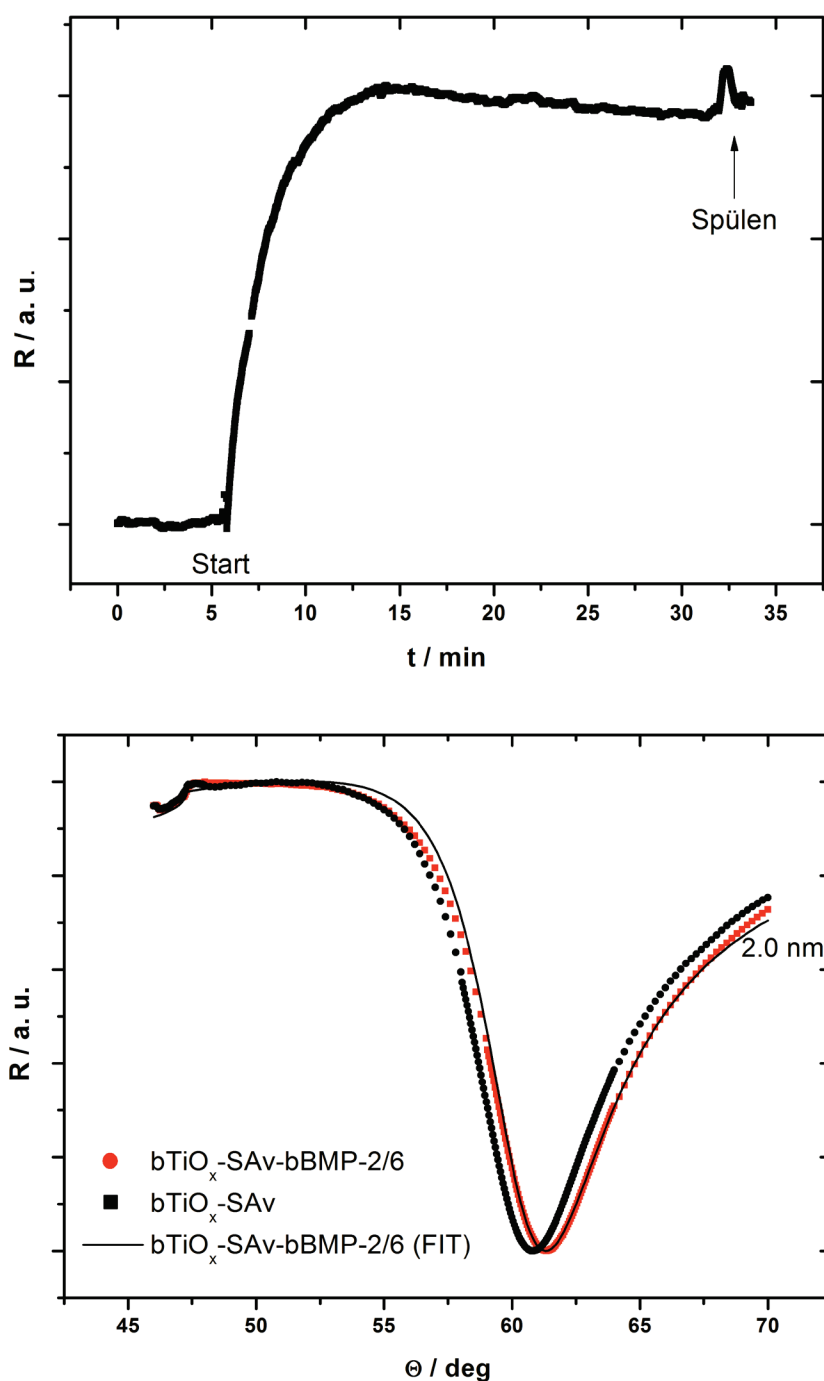


Abb. 4-41: Kinetik in Echtzeit (oben) und SPR-Scans (unten) der Immobilisation von biotinyliertem BMP-2/6 auf das molekulare Schichtsystem. Der Wachstumsfaktor wurde mit einem molaren Biotinüberschuss von 1:2 (Protein:Biotin) biotinyliert.

Die Selektivität des Schichtsystems wurde durch die Tatsache bestätigt, dass ausschließlich die biotinylierte Form des Wachstumsfaktors BMP-2 an den Streptavidinmonolayer gebunden hat. Die unspezifische Bindung von BMP-2 an das molekulare Schichtsystem wurde unterdrückt. Dies gewährleistet eine hochspezifische Funktionalisierung und bietet eine attraktive Möglichkeit, TiO_x-

Oberflächen osteoinduktiv zu biofunktionalisieren. Bei gängigen Methoden der Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren werden häufig Konzepte umgesetzt, die auf der Physisorption des Wachstumsfaktors basieren. Bei diesen Konzepten kommt es aber zu folgenden Problemen:

- I) Der physisorbierte Wachstumsfaktor kann von der Oberfläche in andere Gewebe diffundieren und dort seine Wirkung entfalten.
- II) Plasmaproteine aus dem Blut überdecken den physisorbierten Wachstumsfaktor und schränken ihn so in seiner Wirksamkeit ein.

Um dem Problem der Diffusion und der Überlagerung durch eine Proteinschicht entgegenzuwirken, wurden in verschiedenen Untersuchungen teils sehr hohe Mengen an BMP-2 eingesetzt, die in keinem Verhältnis zur physiologisch vorkommenden Konzentration des Wachstumsfaktors standen. Durch diese unphysiologisch hohen Dosierungen sind mittlerweile eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen bekannt, wie bereits unter Abschnitt 2.1.1 erläutert. Dies kann mit dem hier beschriebenen Schichtsystem vermieden werden. Die Menge an immobilisiertem bBMP-2 ist begrenzt auf eine theoretisch maximale Oberflächendichte von 135 ng cm^{-2} . Nimmt man den Extremfall an, dass sich an einem biofunktionalisierten Dentalimplantat die komplette Beschichtung bei der Implantation auf einmal ablöst (Oberfläche ca. 400 mm^2), entspräche dies theoretisch einer Gesamtmenge von 540 ng BMP-2 oder 20 pmol . Verglichen mit BMP-2-Mengen, die in anderen Studien verwendet wurden und bei denen Entzündungsreaktionen o. ä. beobachtet wurden, fallen die hier verwendeten Mengen in Bezug auf unerwünschte Nebeneffekte nicht ins Gewicht.⁽²⁹⁾ Teilweise wurde in klinischen Applikationen Mengen bis zu 12 mg eingesetzt.⁽²⁶³⁾ Diese Mengen sind um den Faktor 2.2×10^4 größer als die theoretisch maximale Beladung bei der hier vorgestellten Biofunktionalisierung. Wichtig ist in diesem Kontext, dass das bBMP-2 auf dem antiadhäsiven Streptavidinmonolayer immobilisiert ist, d. h. nicht in die Umgebung diffundieren kann. Daher ist die Wirkung lokal begrenzt, Nebenwirkungen wie ektope Knochenbildung sind somit nicht zu erwarten. Gleichzeitig ist die Verfügbarkeit des Wachstumsfaktors lokal recht hoch. Die immobilisierte Menge von 40 ng cm^{-2} ist für die Initialisierung der entsprechenden Signalkaskaden ausreichend. Wie von Schwab et al. kürzlich gezeigt, sind für die Stimulation des Smad-abhängigen Signalweges bereits immobilisierte Mengen von 0.2 ng cm^{-2} ausreichend.⁽⁶⁵⁾

Weitere Ansätze aus der Forschung haben ebenfalls zum Ziel, das BMP-2 kovalent auf eine Oberfläche zu koppeln, um Diffusion in andere Gewebe zu verhindern.^{(32),(33)} Hierbei kann es aber je nach eingesetzten Reagenzien zum Crosslinking der Wachstumsfaktoren untereinander kommen.⁽³³⁾ Die Wachstumsfaktoren sind dann nicht mehr biologisch aktiv. Zudem ist bei einer kovalenten Immobilisation des Wachstumsfaktors häufig die Orientierung auf der Oberfläche ungünstig für eine Bindung an den Rezeptor. Es gibt nur wenige Ansätze, die eine Kontrolle der Orientierung gewährleisten können.⁽³²⁾ In dem hier vorgestellten Ansatz wird dieses Problem durch Einsatz eines flexiblen Spacers von 2.2 nm Länge gelöst. Außerdem besteht in allen Ansätzen solcher Art das Problem der unspezifischen Immobilisierung von Plasmaproteinen, wenn nicht vorher eine antiadhäsive Schicht zusätzlich aufgebracht wird. Genau dieses Problem wird mit dem hier vorgestellten multifunktionalen Schichtsystem umgangen.

Zusammenfassend bietet der hier vorgestellte Biofunktionalisierungsansatz eine attraktive Alternative zur Präparation osteoinduktiver Implantate, da die unter Abschnitt 2.1.1 erwähnten Problematiken hiermit gelöst werden können.

4.3.4 Duale Biofunktionalisierung mit bBMP und bFn

Multilagenschichtsystem mit biotinyliertem Fibronektin und bBMP-2

Um einen möglichen Kombinationseffekt von biotinyliertem BMP-2 mit dem Adhäsionsprotein Fibronektin untersuchen zu können, wurde ein Multilagenschichtsystem entsprechend Abschnitt 3.3.3 auf TiO_x-Modelloberflächen aufgebracht (Abb. 3-6). Hierbei wurde auf eine mit Streptavidin biofunktionalisierte TiO_x-Modelloberfläche ein Layer biotinyliertes Fibronektin appliziert und anschließend eine weitere Lage Streptavidin. An diesen zweiten Streptavidinlayer wurde biotinyliertes BMP-2 gebunden und in Echtzeitkinetik analysiert.

In der Echtzeitkinetik wurde beobachtet, dass die verschiedenen Schichten bis zum zweiten Streptavidinlayer stabil aufgebracht werden können (Abb. 4-41). In der Kontrolle zeigte sich zudem, dass die zweite Streptavidinlage spezifisch an das bFn und nicht an potentiell freie Biotingruppen auf der Oberfläche band (Abb. 4-45). Auch die Adsorption von bBMP-2 an die zweite Streptavidinschicht war möglich, allerdings nicht stabil. Sobald mit Lösungsmittel gespült wurde, nahm die Reflektivität signifikant ab. Dies ist zusätzlich aus den SPR-Scans ersichtlich (Abb. 4-43).

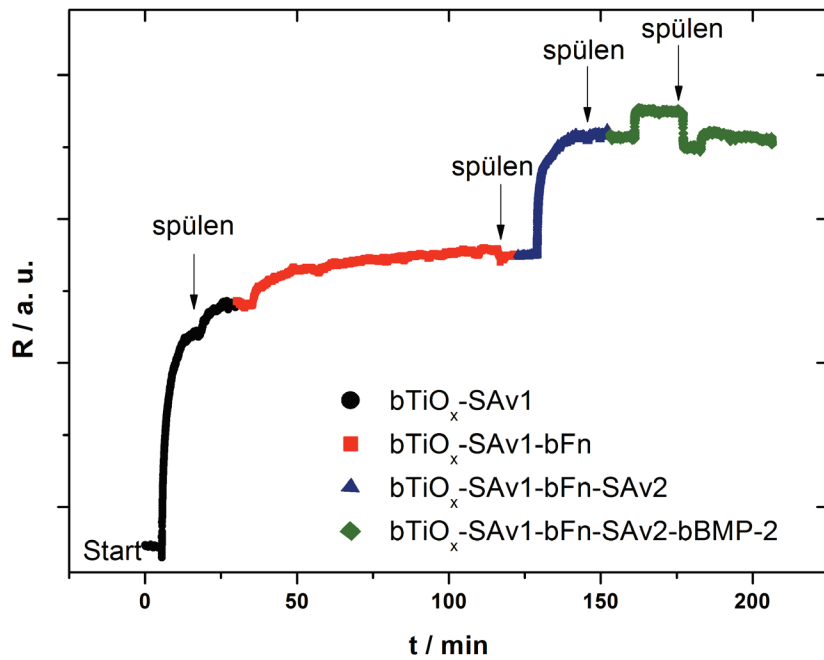


Abb. 4-42: Kinetikverlauf in Echtzeit bei der Bildung der einzelnen Lagen des Multilagenschichtsystems. Das Multilagenschichtsystem ist bis zur 2. Streptavidinlage stabil. Biotinyliertes BMP-2 kann nicht mehr stabil aufgebracht werden.

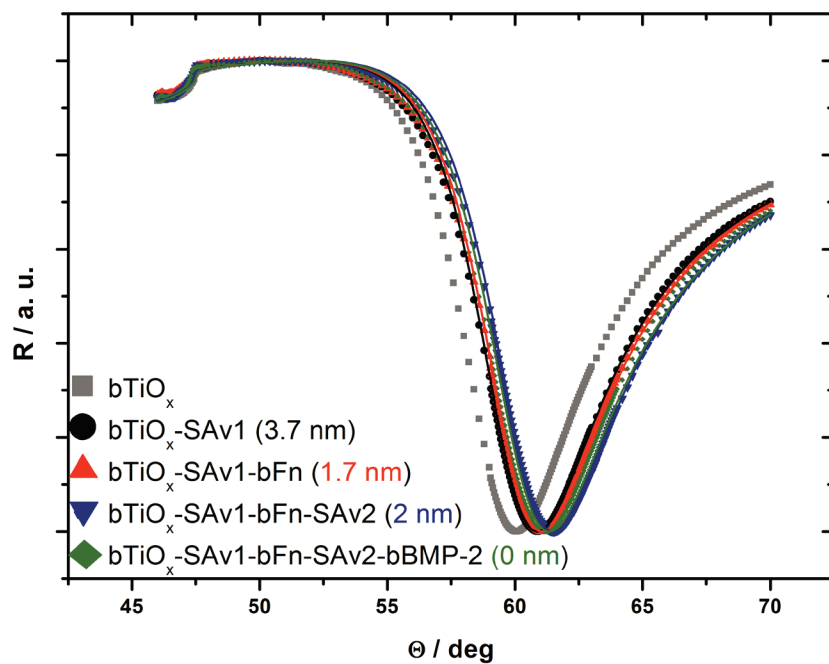


Abb. 4-43: SPR-Scans der biotinylierten TiO_x -Oberfläche beim sequentiellen Aufbau des Multilagenschichtsystems. Nach Adsorption des biotinylierten BMP-2 konnte kein Schichtdickenzuwachs beobachtet werden. Die Fits sind als Linie in der entsprechenden Farbe über den jeweiligen Scan gelegt.

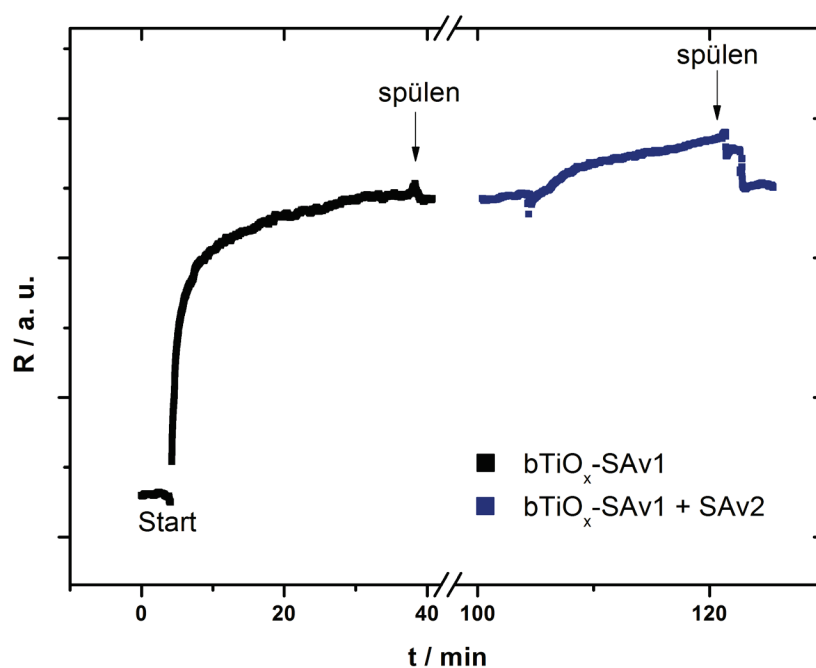


Abb. 4-44: Referenzkinetik in Echtzeit von Streptavidin auf einer bereits mit Streptavidin abgesättigten Oberfläche. Der beobachtete Schichtdickenzuwachs ist physisorbiertes Streptavidin, welches beim Spülen nicht auf der Oberfläche verbleibt.

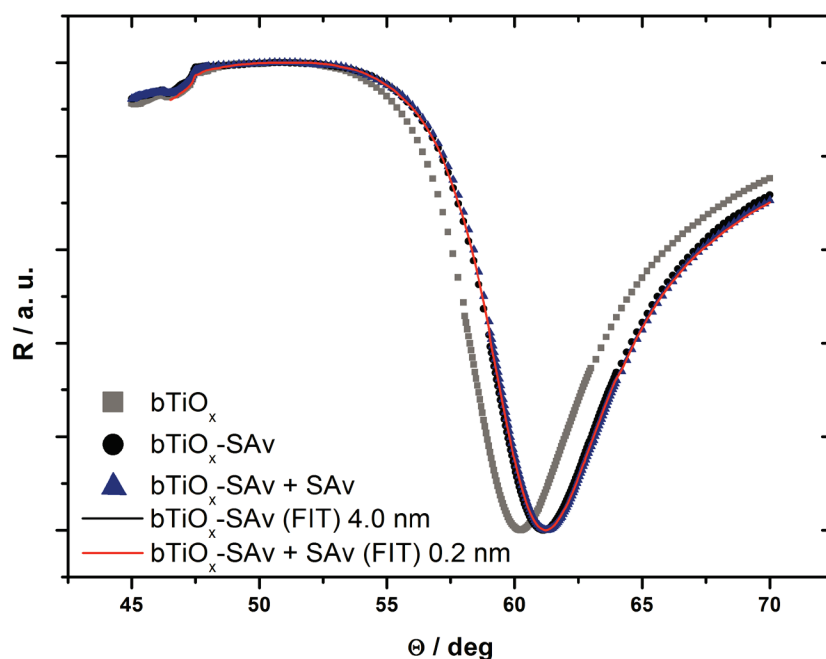


Abb. 4-45: Die entsprechenden SPR-Scans nach Adsorption des ersten und des zweiten Streptavidinmonolayers zeigen, dass für die Anbindung einer weiteren Streptavidinlage keine Biotinplätze mehr zur Verfügung stehen.

Das Multilagenschichtsystem ist ab einer bestimmten Größe thermodynamisch nicht mehr stabil. Biotinyliertes Fibronectin auf Streptavidin bietet genügend Bindungsplätze für einen weiteren Streptavidinmonolayer, allerdings sind die Biotingruppen auf bFn nicht annähernd so dicht wie auf der biotinylierten TiO_x-Oberfläche. Hier wurde bereits in Arbeiten von Spinke et al. gezeigt,^{(264),(265)} dass für eine optimale Anbindung von Streptavidin an je zwei Biotinkopfgruppen eine bestimmte Biotindichte aufgebracht werden muss. Diese darf nicht zu dicht, aber auch nicht zu gering sein. In letzterem Fall kann Streptavidin mit nur einer Bindungstasche an Biotin binden, was eine geringere Stabilität zur Folge hat. Dies schien im oben gezeigten Versuch bei der Aufbringung des zweiten Streptavidinlayers der Fall zu sein, da der Biotinylierungsgrad (DOL) für bFn nur 45 Biotine pro Fn-Molekül beträgt. Für ein Multilagenschichtsystem mit zwei Streptavidin- und zwei bFn-Lagen konnte durch Lehnert et al. auch gezeigt werden, dass die Stabilität dieser Bindung von der Anzahl an Biotingruppen auf dem biotinylierten Protein abhängt.⁽¹⁶⁾ Dies führt zu einer höheren Dissoziationskonstante von Streptavidin. Bindet an diese Streptavidinschicht nun ein weiteres biotinyliertes Molekül wie bBMP-2, ist diese Bindung noch instabiler. Offensichtlich reicht die Bindungsstärke nicht aus, um den bei einem Spülvorgang von 10 mL min⁻¹ auftretenden Kräften zu widerstehen. Wie aus den SPR-Scans ersichtlich (Abb. 4-43), scheint auch die Stabilität der zweiten Streptavidinlage in wässriger Lösung bereits reduziert zu sein, da auch hier die Schichtdicke geringfügig abnahm. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stabilität eines zweiten Streptavidinlayers selbst in gepufferter Salzlösung signifikant geringer als die des ersten Monolayers ist.⁽¹⁹⁾

Zusammenfassend lässt sich hieraus schlussfolgern, dass ein solches Multilayer-schichtsystem für die Anwendung auf Implantatoberflächen nicht tauglich erscheint. Eine schnelle Ablösung des Schichtsystems ist im Kontext der Biofunktionalisierung von Implantaten unerwünscht. Aus diesem Grund wurde als alternativer Ansatz für eine duale Biofunktionalisierung mit bFn und bBMP-2 die Co-Immobilisation beider Proteine gewählt.

Co-Immobilisation von bBMP mit biotinyliertem Fibronectin (bFn)

Für die Co-Immobilisation von biotinyliertem Fibronectin (bFn) mit bBMP-2 oder bBMP-2/6 wurden verschiedene molare Konzentrationsverhältnisse entsprechend Tabelle 4-4 auf eine mit Streptavidin biofunktionalisierte TiO_x-Modelloberfläche

adsorbiert und über einen fluoreszenzgekoppelten SPR-Scan analysiert. Die Ergebnisse zeigten ein Maximum der Fluoreszenzintensität für die Adsorption von bFn in Abwesenheit von bBMP-2 und ein Minimum für die Adsorption von bBMP-2 in Abwesenheit von bFn. Für die Adsorption in einem molaren Konzentrationsverhältnis von 1:10 (bFn:bBMP) ergab sich ein Verhältnis von 1:1 auf der Oberfläche. Dies resultierte in unterschiedlichen Bedeckungsgraden mit bFn bzw. bBMP (Abb. 4-46).

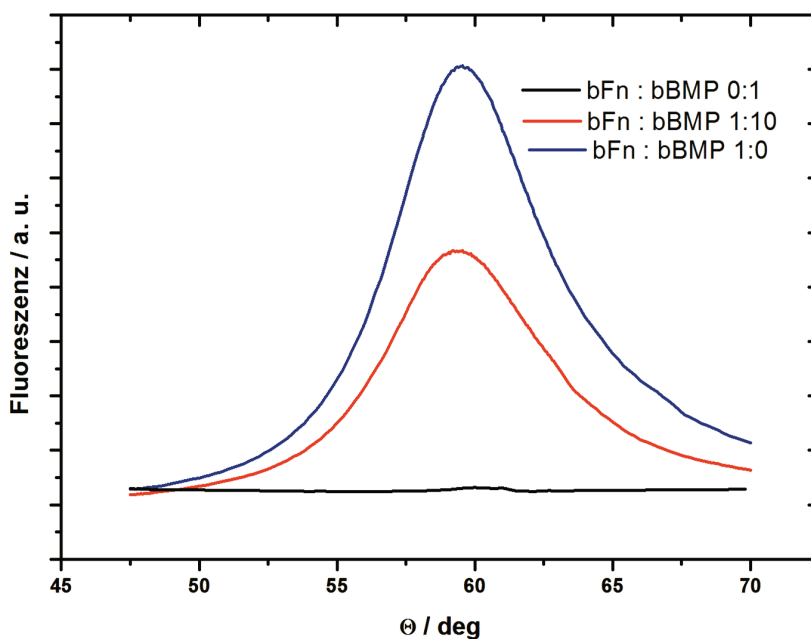


Abb. 4-46: Fluoreszenzintensität nach der Adsorption von Streptavidin-Atto633 auf ein Streptavidin-monolayer, der mit verschiedenen molaren bFn:bBMP Verhältnissen inkubiert wurde (0:1, 1:10; 1:0).

Tabelle 4-4: Verschiedene molare Konzentrationsverhältnisse von bFn und bBMP-2 resultieren in unterschiedlich adsorbierten Mengen auf der Oberfläche (SD).

| Verhältnis (bFn:bBMP) in nM | SD bFn / ng cm ⁻² | SD bBMP / ng cm ⁻² |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0:250 | 0 | 40 |
| 50:250 | 20 | 20 |
| 50:0 | 32.5 | 0 |

Zur Bestimmung der entsprechenden Oberflächendichten wurde das Verhältnis der emittierten Fluoreszenz herangezogen. Es konnte keine Fluoreszenz detektiert werden, wenn auf die Streptavidin-funktionalisierte Oberfläche das Fluoreszenz-markierte Atto633-Streptavidin gegeben wurde. Dies zeigt, dass die Oberfläche bereits mit Streptavidin abgesättigt ist und Atto633-Streptavidin nicht unspezifisch binden kann. Wurde kein biotinyliertes Fibronektin auf die Oberfläche gegeben,

konnte ebenfalls keine Fluoreszenz detektiert werden. Dies belegt, dass die Bindung von Atto633-Streptavidin nur an die freien Biotingruppen im bFn möglich ist. Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass bFn eine DOL von ca. 45 aufweist.⁽¹⁶⁾ Damit stehen auch nach der Bindung an die Streptavidinoberfläche genügend Biotingruppen für die Anbindung von Atto633-Streptavidin zur Verfügung. Da bBMP nur einen DOL von 1 besitzt, kann hier kein Atto633-Streptavidin binden. Demzufolge kann bei Zugabe einer Lösung aus bFn und bBMP die Gesamtschichtdicke der adsorbierten Proteine über die Änderung der Reflektivität verfolgt werden, während über die Fluoreszenz der Anteil an gebundenem bFn berechnet werden kann (Tabelle 4-4). Nimmt man an, dass die Fluoreszenzintensität proportional zur adsorbierten bFn-Menge zunimmt, ergibt sich daraus für die Co-Immobilisation, dass bFn allein in etwa die Hälfte der Oberflächendichte ausmacht. Demnach muss die Hälfte der Bindungsplätze bereits von BMP-2 eingenommen sein, was einer Oberflächendichte von etwa 20 ng cm⁻² entspricht. Das unterschiedliche Verhältnis von bBMP-2 und bFn auf der Oberfläche im Vergleich zum eingesetzten Konzentrationsverhältnis kann auf den unterschiedlichen Platzbedarf auf der Oberfläche zurückzuführen sein. BMP-2 ist mit 21 nm² Platzbedarf wesentlich kleiner als Fibronectin. Dieses adsorbiert auf TiO_x-Oberflächen in einer globulären Konformation. In dieser Konformation ist der Platzbedarf etwa 225 nm². Lehnert et al. zeigten allerdings, dass biotinyliertes Fibronectin auf Streptavidin-biofunktionalisierten Oberflächen nicht in globulärer, sondern in linearer, leicht V-förmiger Konformation adsorbiert.⁽²⁰⁾ Die Länge eines Moleküls beträgt hier 189±20 nm.⁽²⁶⁶⁾ Da die Fibronectinmoleküle hier nicht parallel nebeneinander angeordnet sind, sondern eher eine V-förmige Konformation besitzen, kann der Platzbedarf für ein biotinyliertes Fibronectinmolekül in Abhängigkeit des Winkels der beiden Arme des Vs ca. 360 nm² bis 4050 nm² betragen. Damit ist der Platzbedarf um ein Vielfaches größer als beim bBMP-2 und kann als Erklärung herangezogen werden, warum bFn trotz der zehnfachen Konzentration von bBMP-2 etwa die Hälfte der Bindungsplätze belegt.

Zusammenfassend erwies sich der Co-Immobilisationsansatz als zuverlässige Alternative zum Multilagenschichtsystem, um eine duale Biofunktionalisierung mit verschiedenen biotinylierten Proteinen auf eine Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x-Oberfläche aufzubringen und zu analysieren.

4.3.5 Auswirkungen multifunktionalisierter Oberflächen auf humane Osteoblasten Zellfläche

Die in Abb. 4-47 dargestellten biofunktionalisierten TiO_x -Modelloberflächen wurden entsprechend Abschnitt 3.4.6 präpariert. Die Adhäsion humaner Osteoblasten auf diesen verschiedenen biofunktionalisierten Oberflächen wurde für den Zeitraum von 21 h analysiert, da in diesem Zeitfenster nach Implantation die entscheidenden Interaktionen von Körpergewebe mit dem Implantat stattfinden, die für die weitere Integration richtungsweisend sind.

Die mikroskopische Zellflächenanalyse zeigte eine signifikante Zunahme ($p = 0.01$, Kruskal-Wallis) der Adhäsion von humanen Osteoblasten auf den mit bBMP-2, bFn oder mit beiden Proteinen biofunktionalisierten TiO_x -Modelloberflächen innerhalb von 21 h nach Aussaat. Bei TiO_x -Modelloberflächen ohne Biofunktionalisierung und mit antiadhäsiver Streptavidin-Biofunktionalisierung war dagegen eine deutlich verlangsamte Zunahme der Adhäsion festzustellen. Hier waren die Zellen auch nach einigen Stunden noch nicht adhären. Dies konnte anhand der Spreitung der humanen Osteoblasten erkannt werden, welches ein Maß für die Adhäsion ist.⁽¹⁸⁾ Zudem zeigte sich eine größere Zellfläche und höhere Zellzahlen für Oberflächen, die dual mit einem Wachstumsfaktor (bBMP-2 oder bBMP-2/6) und bFn biofunktionalisiert waren (Abb. 4-47).

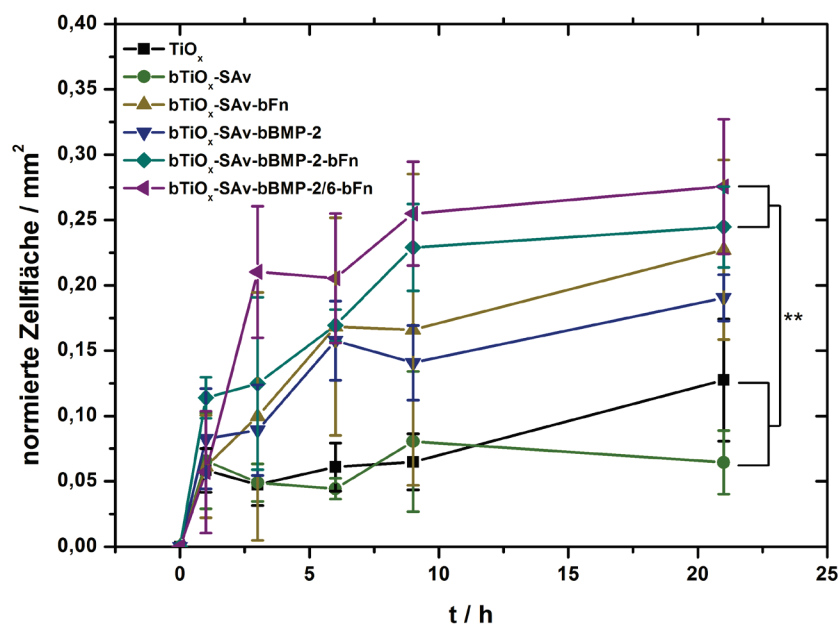


Abb. 4-47a: Zellfläche humaner Osteoblasten, normiert auf die Zellzahl von verschiedenen biofunktionalisierten Oberflächen.

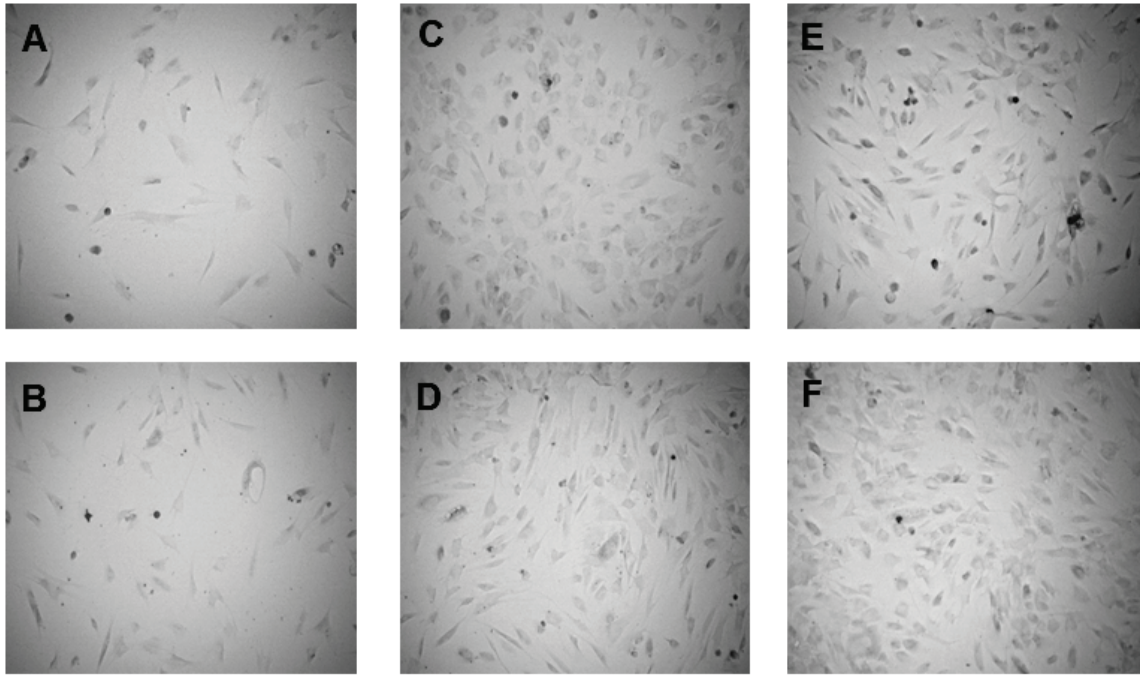


Abb. 4-47b: Repräsentative Zellbilder nach 21 h. Die biofunktionalisierten Oberflächen (C-F) zeigten eine signifikant ($p = 0.01$, Kruskal-Wallis) höhere Zellfläche verglichen mit nativem TiO_x und $\text{bTiO}_x\text{-SAv}$ (A-B). Die Kombination von Wachstumsfaktoren mit biotinyliertem Fibronectin resultierte zudem in einer höheren Zellfläche als die Biofunktionalisierung mit nur einem der Proteine (E-F).

In den ersten Stunden nach einer Implantation wird die Oberfläche eines Implantats körpereigenen Zellen, Gewebeflüssigkeit und Bakterien präsentiert. Kann die Oberfläche in dieser Phase mit Knochenzellen besiedelt werden, reduziert sich das Risiko einer bakteriellen Infektion erheblich.⁽²⁰⁴⁾ Zudem wird die stabile Integration eines Implantats in das körpereigene Gewebe hauptsächlich dadurch gewährleistet, dass Osteoblasten neues Knochengewebe um das Implantat aufbauen. Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Adhäsion von Osteoblasten an die Implantatoberfläche. Der Adhäsionsvorgang wird durch Fibronectin verstärkt. Im Fibronectin kommt mehrfach eine Sequenz der Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) vor. Diese Sequenz dient als fokaler Kontaktpunkt für Integrine.⁽²⁶⁷⁾ Wird Fibronectin auf eine Titanoberfläche physisorbiert, adsorbiert es in globulärer Konformation. In eigenen Vorarbeiten der AG Biophysik konnte gezeigt werden, dass biotinyliertes Fibronectin bei Adsorption auf den Streptavidinmonolayer in einer linearen, entfalteten Konformation vorliegt. Dabei werden die RGD-Domänen freigelegt, die in der globulären Konformation im Inneren verborgen liegen.⁽²⁰⁾ Dies erklärt die beobachtete Zunahme der Zellfläche der humanen Osteoblasten auf allen Probenkörpern, die mit Fibronectin biofunktionalisiert waren. Für die mit bBMP-2 biofunktionalisierten Probenkörper zeigten sich ebenfalls eine erhöhte Zellfläche und stärkere Proliferation. BMPs sind Wachstumsfaktoren, die in Osteoblasten und

deren Vorläuferzellen Differenzierung, Proliferation und Osteoinduktion über einen Smad-abhängigen Signalweg oder den p38-Signalweg induzieren können.⁽²⁶⁸⁾ Wachstumsfaktoren sind Zytokine, die üblicherweise von Zellen sezerniert werden. Das solubilisierete BMP-2 bindet an seinen entsprechenden Rezeptorkomplex, der internalisiert wird und über die genannten Signalwege die Transkription der Zielgene induziert.⁽²⁶⁹⁾ Lange Zeit war nicht bekannt, ob die Internalisierung des Wachstumsfaktors durch die Zelle essentiell für die Signaltransduktion ist. Erst innerhalb des letzten Jahrzehnt wurde von einigen Wachstumsfaktoren gezeigt, dass die immobilisierte Form biologisch ebenfalls aktiv ist.^{(24),(32)} Im Besonderen zeigte Crouzier et al., dass immobilisiertes BMP-2 ebenfalls aktiv ist und der biologische Effekt sogar stärker als bei gelöstem BMP-2.⁽⁴³⁾ Der gleiche Effekt scheint nun aufzutreten, wenn das BMP durch ein Biotin an Streptavidin konjugiert ist. Es kann nicht in die Zellen internalisiert werden und stimuliert daher kontinuierlich den Rezeptor.⁽⁶⁵⁾ Daraus resultiert die beobachtete stärkere Dosis-Wirkungs-Beziehung für immobilisiertes BMP-2. Dies ist von besonderer Bedeutung in der Fragestellung nach einer Reduktion der applizierten Wachstumsfaktormenge. In der klinischen Praxis wurden Gesamtmengen von 12 mg eingesetzt,⁽²⁶³⁾ die hier eingesetzte Menge war mit einer Gesamtmenge von knapp 0.3 µg etwa um den Faktor 40.000 niedriger. Trotzdem konnte eine signifikante Erhöhung der Zellproliferation festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden zudem von Schwab et al. gestützt, die als Untergrenze für eine Stimulation der BMP-induzierten Signaltransduktion eine Menge von 0.2 ng cm⁻² gegenüber 5 ng solubilisiertem BMP-2 belegen konnten.⁽⁶⁵⁾ Es zeichnet sich ab, dass immobilisierte Wachstumsfaktoren in der Zukunft bei Ansätzen zur Biofunktionalisierung von Implantaten mit geringen Wachstumsfaktormengen eine bedeutende Rolle spielen werden.

Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, wie der biologische Effekt weiter verstärkt werden kann: Die Kombination eines Wachstumsfaktors (bBMP-2 oder bBMP-2/6) mit bFn resultierte ebenfalls in einer ca. 30 % höheren Proliferation und Zellfläche als bei dem Wachstumsfaktor oder dem Adhäsionsprotein allein. Die Ursache kann auf den kombinierten Effekt von BMP-2 und dem Fibronectin zurückgeführt werden. Fibronectin fördert die Adhäsion der Zellen, BMP-2 stimuliert die Proliferation. Darüber hinaus ist bekannt, dass die durch BMP-2 stimulierten Signalwege die Möglichkeit für *Crosstalk* mit Signalwegen für Adhäsion besitzen.^{(270)–(272)} *In vivo* wird die Adhäsion und Proliferation von Zellen nicht nur von einem Zytokin gesteuert, sondern durch ein komplexes, zeitlich und räumlich

reguliertes Zusammenspiel verschiedener Zytokine und Komponenten der extrazellulären Matrix. Für innovative Biofunktionalisierungsansätze empfiehlt es sich daher, mehr den Regenerationsprozess *in vivo* nachzubilden und dafür weitere Proteine und Zytokine einzusetzen. Dadurch könnten die osteogenen Effekte weiter verstärkt werden und die eingesetzte Menge an Wachstumsfaktoren weiter verringert werden, sodass die mit der Überdosis an Wachstumsfaktoren assoziierten Nebenwirkungen nicht mehr von Bedeutung sind.⁽²⁷⁰⁾

Die immobilisierte, heterodimere BMP-2/6 Variante zeigte keine signifikant höhere Stimulation auf humane Osteoblasten als das BMP-2 Homodimer. Das BMP-6 Homodimer wurde nicht getestet, da es nach bisherigen Erkenntnissen kein osteoinduktives Stimulationspotential besitzt. Das osteoinduktive Potential der solubilisierten Form des BMP-2/6 Heterodimers wird allgemein als signifikant höher als das des BMP-2 Homodimers eingeschätzt.^{(273),(274)} Dies wurde für die immobilisierte Variante bisher nicht untersucht. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte eine höhere Osteoinduktivität der immobilisierten heterodimeren BMP-2/6-Variante nicht bestätigt werden. Die höhere Osteoinduktivität der solubilisierten heterodimeren Variante wird mit einer geringeren Sensitivität gegenüber natürlichen BMP-Antagonisten wie Noggin in Verbindung gebracht.^{(275),(276)} BMP-2 induziert selbst die Aktivierung seines Antagonisten Noggin.^{(277),(278)} Folglich sind Ansätze mit hohen BMP-2 Mengen nicht vielversprechend, da hier durch die Aktivierung von Noggin ein Großteil des BMP-2 inaktiviert wird. BMP-2 besitzt eine Bindungsstelle für Noggin, BMP-6 nicht. Ein BMP-2/6-Heterodimer ist daher weniger sensitiv für Noggin. Dieser Effekt scheint aber bei immobilisierten BMP-2/6-Varianten von geringerer Bedeutung zu sein als bei immobilisierten BMP-2-Varianten. Die Wirkungsweise von Noggin besteht darin, dass das Protein sich auf die Rezeptorbindestelle für die BMPR-I- und -II-Rezeptoren legt und so eine Stimulation verhindert. Wenn das immobilisierte bBMP-2-Homodimer allerdings bereits an den Rezeptor gebunden bleibt und diesen konstant stimuliert, kann Noggin nicht mehr binden und das BMP-2 inaktivieren. Da dies sowohl bei immobilisiertem bBMP-2 als auch bei bBMP-2/6 geschieht, bietet das Heterodimer keinen „Vorteil“ mehr. Um diese Vermutung zu untermauern, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, die den Rahmen dieser Arbeit bei weitem sprengen würden.

Analyse osteoblastärer Marker

Zusätzlich zu der Zellfläche wurden 24, 48 und 72 h nach Aussaat charakteristische osteogene Marker, die häufig als Indikatoren für eine beginnende Ossifikation herangezogen werden, mit qRT-PCR untersucht. Dazu zählt die Alkalische Phosphatase (ALP), Osteonektin (OSN) und Osteocalcin (OCN).⁽²⁷⁹⁾ Die Expression dieser Marker erfolgt sequentiell entsprechend dem Verlauf der Osteoblastenentwicklung. Diese lässt sich in drei Phasen einteilen: Die ersten zehn Tage umfassen die Proliferation, anschließend folgt die Reifung der extrazellulären Matrix (EZM) und ab ca. Tag 20 die Mineralisierung der EZM.⁽²⁸⁰⁾ Die osteogenen Marker wurden nach Korrektur auf die Housekeeping-Gene (β -Aktin und Glycerinaldehyddehydrogenase, GAPDH) auf TiO_x als Referenz normiert. Die Expression der verschiedenen Marker zeigte kein einheitliches Profil. Die Alkalische Phosphatase war zu allen Zeitpunkten bei allen Vergleichsgruppen nur gering exprimiert, häufig sogar geringer als in der Referenz auf TiO_x . Osteocalcin war an Tag 1 auf allen Vergleichsgruppen stärker exprimiert als auf der Referenz. Dieses Muster zeigte sich in schwächerer Ausprägung auch an Tag 3 und deutlich an Tag 7. Hier konnte besonders in den Vergleichsgruppen bBMP-2 und bFn eine deutlich höhere Expression als in der Referenz festgestellt werden. Osteonektin zeigte bis auf eine singulär starke Expression in der Gruppe bBMP-2 an Tag 7 im Rahmen der Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede zur TiO_x -Referenz (Abb. 4-48).

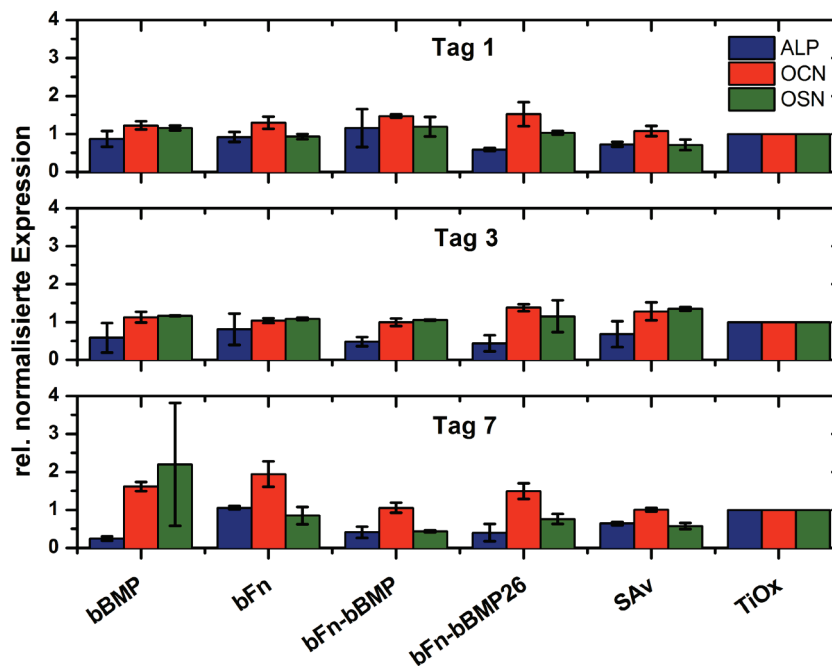


Abb. 4-48: Expressionslevel der verschiedenen osteogenen Marker (ALP, OCN und OSN) an den Tagen 1, 3 und 7 nach Aussaat auf verschiedenen biofunktionalisierten Oberflächen. Die Expressionslevel wurden auf β -Aktin und GAPDH normiert und sind relativ zum Expressionslevel auf unbeschichtetem TiO_x dargestellt.

Die qRT-PCR-Untersuchung der Expressionslevel der mRNA der osteogenen Marker ergab keine eindeutige Tendenz. Insbesondere bei ALP zeigte sich bei der TiO_x -Referenzgruppe an allen Tagen eine deutlich höhere Expression als in den biofunktionalisierten Gruppen. Dies ist verwunderlich, da die Alkalische Phosphatase als klassischer Marker für die Differenzierung von Osteoblasten oder deren Vorläuferzellen gilt.⁽²⁸¹⁾ Die Alkalische Phosphatase ist direkt an der Mineralisierung beteiligt, indem sie lokal eine hohe Konzentration an Phosphat erzeugt, sodass Calciumphosphat ausfallen kann.⁽²⁸²⁾ Die mikroskopischen Bilder sowie die Auswertung der Zellfläche deuteten auf eine verstärkte Proliferation hin. Die Expression der ALP nimmt üblicherweise in stimulierten Osteoblasten von ca. Tag 3 an zu, erreicht an Tag 15 ihren Höhepunkt und fällt dann wieder bis Tag 25 ab.⁽²⁸³⁾ Möglicherweise ist der beobachtete Zeitraum zu kurz, als dass sich eine verstärkte Expression in den biofunktionalisierten Gruppen bereits deutlich von der Referenz abhebt.

Für OCN konnte besonders an Tag 1 und Tag 7 in den biofunktionalisierten Gruppen eine z. T. signifikant höhere Expression festgestellt werden. Allerdings war diese Zunahme teils auch in der Vergleichsgruppe mit Streptavidin zu sehen. Diese Gruppe diente aufgrund der antiadhäsiven Beschichtung als Negativkontrolle. Dies würde bedeuten, dass es sich hier um normale heterogene Expressions-

schwankungen dieses Markers in humanen Osteoblasten handelt. Auch andere Gruppen beobachteten bereits ein recht heterogenes Muster in der Expression osteogener Marker bei der Kultivierung von Osteoblasten über 30 Tage.⁽²⁸⁴⁾ Die Ursachen dafür liegen u. a. in dem Reifestatus der Zellen und im Zellzyklus.⁽²⁸⁵⁾ In reifen Osteoblasten ist die Expression von OCN deutlich höher. Dies hängt auch mit den unterschiedlichen Funktionen der Osteoblasten in den verschiedenen Reifestadien zusammen. Osteocalcin kann direkt an Hydroxylapatit und Calcium binden und ist in der Regulation der Mineralisierung des Knochens wichtig.^{(286)–(288)} Da die Mineralisierung in dem Gesamtprozess aber erst recht spät eintritt, wird OCN meist als ein später Marker eingesetzt, dessen verstärkte Expression erst ab Tag 10 bis 15 nachweisbar ist. Wenn er allerdings nachgewiesen werden kann, ist dies sehr aussagekräftig und deutet stark darauf hin, dass in dem Gewebe Mineralisierungsvorgänge stattfinden. Im Anbetracht dieser Ergebnisse scheint der gewählte Zeitraum für den Nachweis von OCN zu kurz gewählt worden zu sein.

Die Expression von OSN ist nach Lian et al. erst ab Tag 4 detektierbar.⁽²⁸⁰⁾ Osteonektin moduliert im Knochenstoffwechsel die Zellmigration und ist in der aktiven Mineralisierung der Kollagenmatrix von Bedeutung. Damit ist es ein geeigneter Indikator für Veränderungen im Knochenstoffwechsel.^{(289)–(291)} Die Schwierigkeit bei der Verwendung von OSN als osteogenen Marker besteht darin, dass OSN auch konstitutiv von Osteoblasten exprimiert wird. Daher ist in humanen Osteoblasten immer ein gewisser Level an OSN vorhanden, der natürlich auch den oben genannten natürlichen Schwankungen unterliegt. Dies muss bei der Interpretation unbedingt berücksichtigt werden. Vor diesem Hintergrund scheint die hohe Expression in der Vergleichsgruppe bBMP-2 nicht von besonderer Bedeutung zu sein. Da der Level in allen anderen Gruppen zu allen Zeitpunkten nicht signifikant von der Referenz abweicht, scheint die erhöhte Expression an Tag 7 in der Gruppe bBMP-2 nicht spezifisch durch das Schichtsystem hervorgerufen zu sein.

Zusammengefasst kann die heterogene Expression der Marker auf natürliche Schwankungen zurückgeführt werden. Die gewählten Zeiträume sind im Hinblick auf die maximale Expression des Markers nicht optimal gewählt. Lediglich die an allen Tagen sichtbare höhere Expression von Osteocalcin kann in der Zusammenschau mit den Daten aus der Proliferations- und Zellflächenbestimmung als zusätzlicher Beleg für die biologische Wirksamkeit des molekularen Schichtsystems herangezogen werden.

4.4 Simulation einer Schnittstelle zwischen Gingiva und Implantat

4.4.1 Biotinylierung eines FGF-2 –Heparin-Komplexes

Simulation der Biotinylierung von FGF-2

Bei der Biotinylierung von FGF-2 ist es durch Einsatz verschiedener Biotinylierungsreagenzien möglich, eine Beeinträchtigung der Rezeptorbindung zu umgehen. Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, wurde in der Aminosäuresequenz von FGF-2 untersucht, welche Reste die Rezeptorbindestelle enthält, die potentiell durch das Biotinylierungsreagenz modifiziert werden könnten. FGF-2 besitzt eine *high-affinity*-Bindestelle und eine *low-affinity*-Bindestelle, die der Heparinbindestelle entspricht⁽²⁹²⁾ (Abb. 4-49). Die Heparinbindestelle ist für die biologische Aktivität nicht essentiell, verstärkt diese aber.

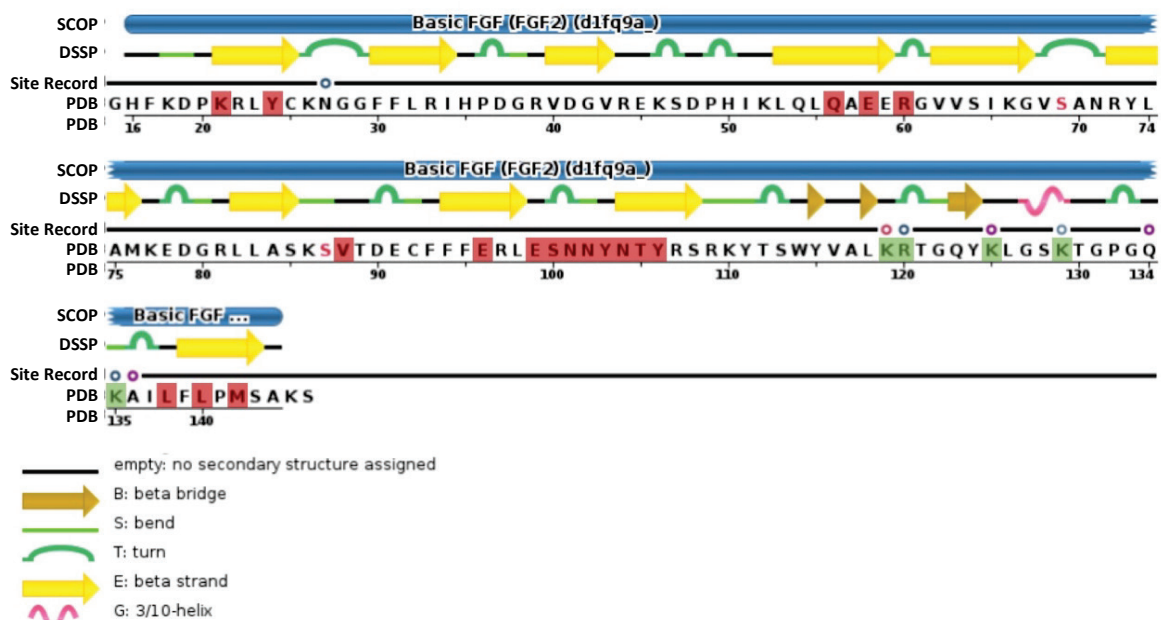


Abb. 4-49: Sequenz und Struktur von FGF-2 auf Basis des PDB-Eintrags 1FQ9.⁽²⁹³⁾ Die Rezeptorbindestelle ist in der Sequenz rot unterlegt, die Heparinbindestelle grün.

Aus Abb. 4-50 ist erkennbar, dass gleich drei Carboxylreste in der Rezeptorbindestelle des FGF-2 liegen, darunter die Reste Glu_{58,96,99}. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit der Biotinylierung eines dieser Reste recht hoch, auch wenn diese z. T. nicht exponiert vorliegen (Abb. 4-51). Aus diesem Grund wurden jegliche an Carboxylgruppen angreifende Biotinylierungsreagenzien verworfen.

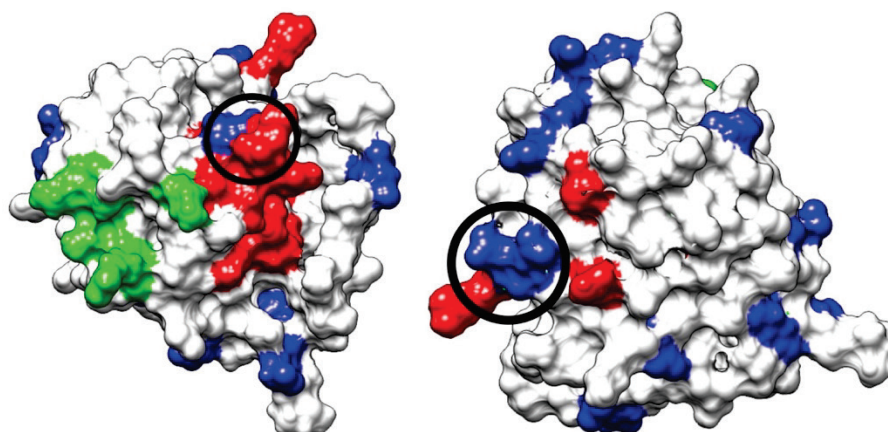


Abb. 4-50: Links: Vorderansicht von FGF-2, Rechts: um 180° rotiertes FGF-2. Rezeptorbindestelle (rot) und Heparinbindestelle (grün) im FGF-2 auf Basis der PDB-Daten von 1BLA.⁽¹⁸²⁾ Die Aminosäurereste mit Carboxylgruppen sind blau dargestellt. Die Carboxylreste, die an der Rezeptorbindung beteiligt sind, sind schwarz eingekreist.

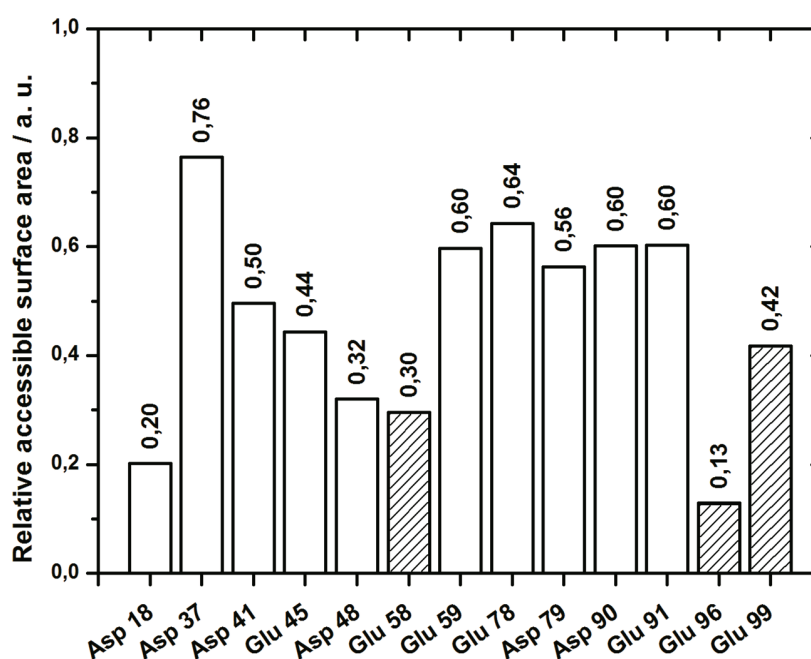


Abb. 4-51: Lösungsmittelzugänglichkeit (RSA) von Aspartat- und Glutamatresten im FGF-2. Die in die Rezeptorbindung involvierten Reste sind schraffiert dargestellt. Die größte Zugänglichkeit für das Biotinylierungsreagenz besteht zwar an Resten, die nicht an der Rezeptorbindung beteiligt sind, aber es sind drei Reste in der Bindestelle, die potentiell biotinyliert werden können.

Abb. 4-53 zeigt, dass Thiolgruppen im Inneren des Proteins verborgen liegen und daher für das Biotinylierungsreagenz nicht gut zugänglich sind. Lediglich das Methionin, welches durch das Startcodon des Gens codiert wird, liegt exponiert vor. Zum Teil wird aber auch eine kürzere Variante des Wachstumsfaktors verwendet, welches nur 146 AS besitzt (so auch in dieser Arbeit). Dabei werden die ersten neun AS entfernt, die u. a. das Methionin enthalten. Das in Abb. 4-52 dargestellte Protein zeigt die Form des 155 AS langen Wachstumsfaktors, da die zur Modellierung von FGF-2 verwendeten Daten von 1BLA diese Modifikation nicht enthalten.

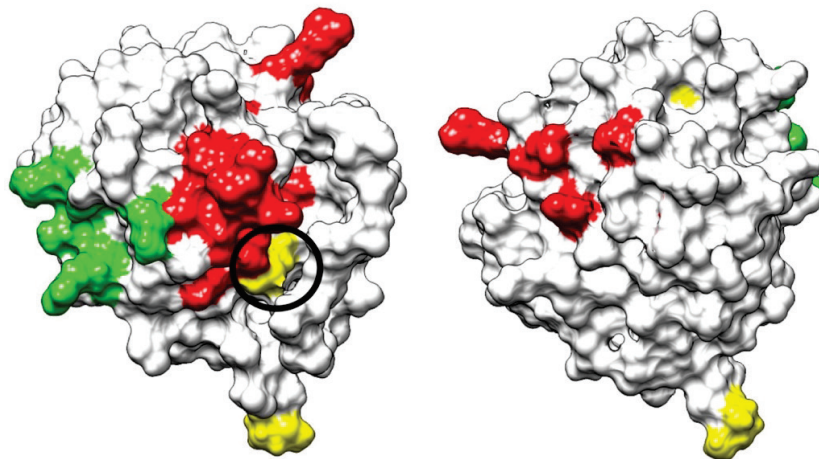


Abb. 4-52: Links: Vorderansicht von FGF-2. Rechts: um 180° rotiertes FGF-2. Die Rezeptorbindestelle (rot) und Heparinbindestelle (grün) im FGF-2 sind auf Basis der PDB-Daten von 1BLA eingezeichnet.⁽¹⁸²⁾ Die Aminosäurereste mit Thiolgruppen sind gelb dargestellt. Der an der Rezeptorbindung beteiligte Thiolrest ist schwarz eingekreist.

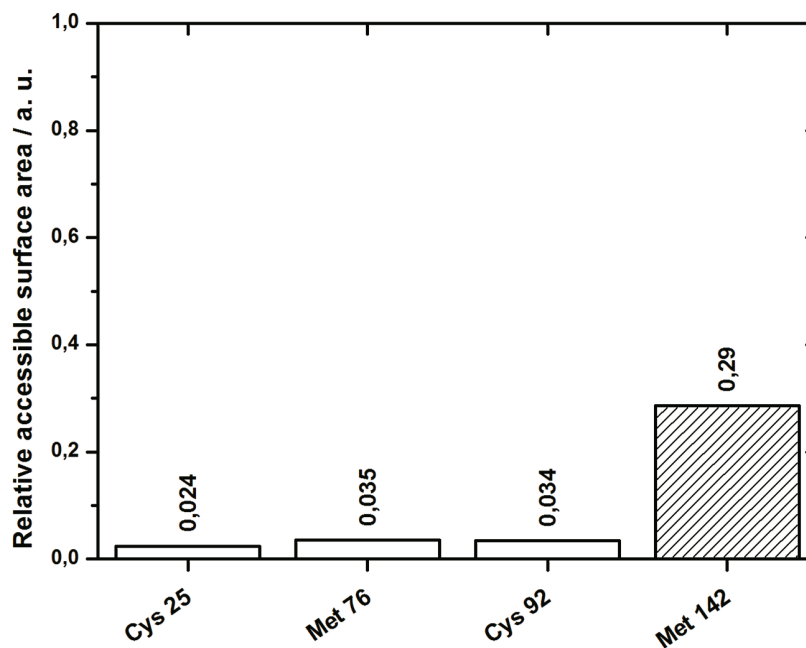


Abb. 4-53: Lösungsmittelzugänglichkeit (RSA) von Thiolresten im FGF-2. Der in der Rezeptorbindung involvierte Rest ist schraffiert dargestellt. Die größte Zugänglichkeit für das Biotinylierungsreagenz besteht an dem Rest, der an der Rezeptorbindung beteiligt ist (Met₁₄₂).

Abb. 4-54 zeigt, dass drei aromatischen Tyrosinreste von FGF-2 ebenfalls genau in der Rezeptorbindestelle liegen (Tyr_{24,103,106}). Auch wenn diese nicht vollständig exponiert vorliegen (Abb. 4-55), wäre das Risiko einer Biotinylierung zu hoch. Daher entfällt auch diese Biotinylierungsmethode.

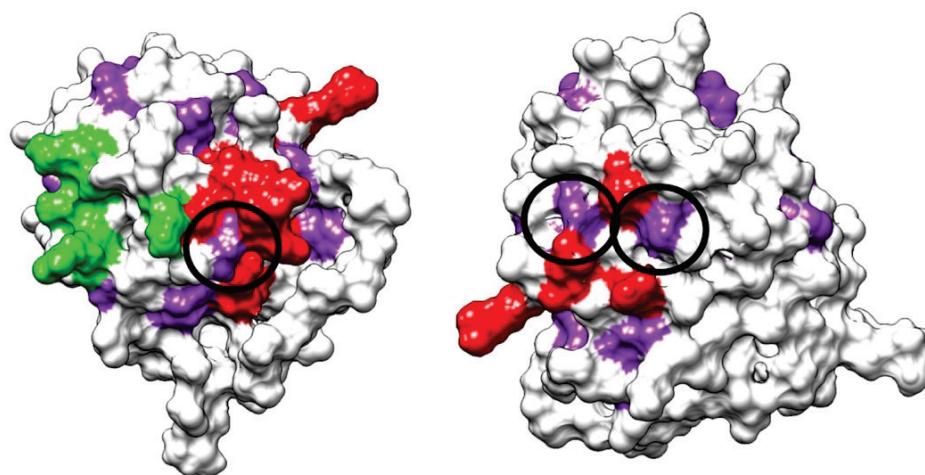


Abb. 4-54: Links: Vorderansicht von FGF-2, Rechts: um 180° rotiertes FGF-2. Die Rezeptorbindestelle (rot) und Heparinbindestelle (grün) im FGF-2 sind auf Basis der PDB-Daten von 1BLA eingezeichnet.⁽¹⁸²⁾ Die aromatischen Aminosäurereste sind violett dargestellt. Die drei an der Rezeptorbindung beteiligten aromatischen Reste sind schwarz eingekreist.

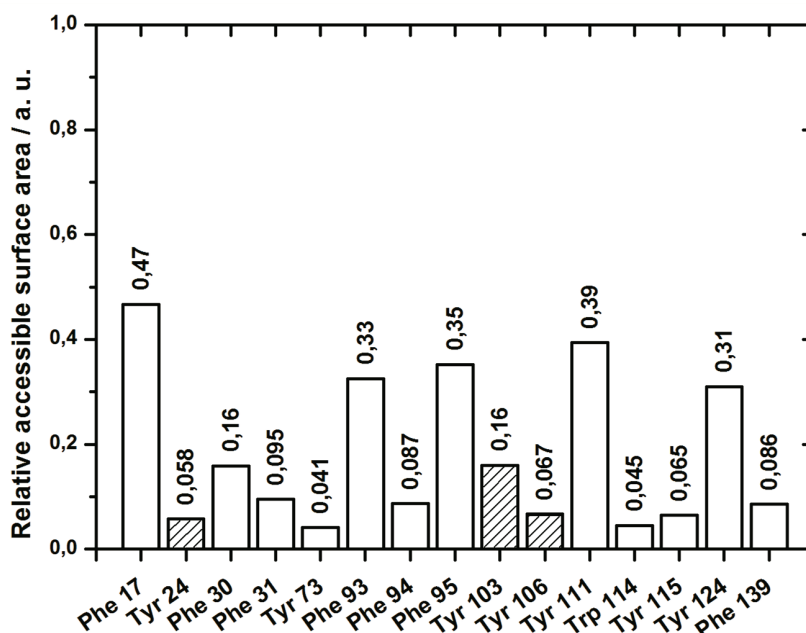


Abb. 4-55: Lösungsmittelzugänglichkeit (RSA) von aromatischen Resten im FGF-2. Die in die Rezeptorbindung involvierten Reste sind schraffiert dargestellt. Die größte Zugänglichkeit für das Biotinylierungsreagenz besteht zwar an Resten, die nicht an der Rezeptorbindung beteiligt sind, aber es sind drei Reste in der Bindestelle, die potentiell durch das Reagenz getroffen werden können.

Die Lysinreste mit primären Aminen liegen nach Abb. 4-56 generell nicht in der *high-affinity*-Bindestelle, z. T. aber in der Heparinbindestelle. Ein Lysinrest (Lys₂₁) ist z. T. in der Rezeptorbindung involviert. Dieser ist aber für das Biotinylierungsreagenz am schlechtesten zugänglich. Die Lysinreste Lys₁₁₉, 125, 129, 135 können potentiell biotinyliert werden. Die Wahrscheinlichkeit der Biotinylierung kann über die Zugänglichkeit der Aminosäurereste abgeschätzt werden. Diese ist für die

Lysinreste des FGF-2 in Abb. 4-57 dargestellt. Demnach ist eine Biotinylierung an den Resten Lys₄₆, 86, 145 am wahrscheinlichsten. Von diesen Lysinresten erfüllt kein Rest eine katalytisch wichtige Funktion. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass die Heparinbindestelle für die biologische Aktivität zwar förderlich ist, aber nicht essentiell.^{(92),(94),(294)}

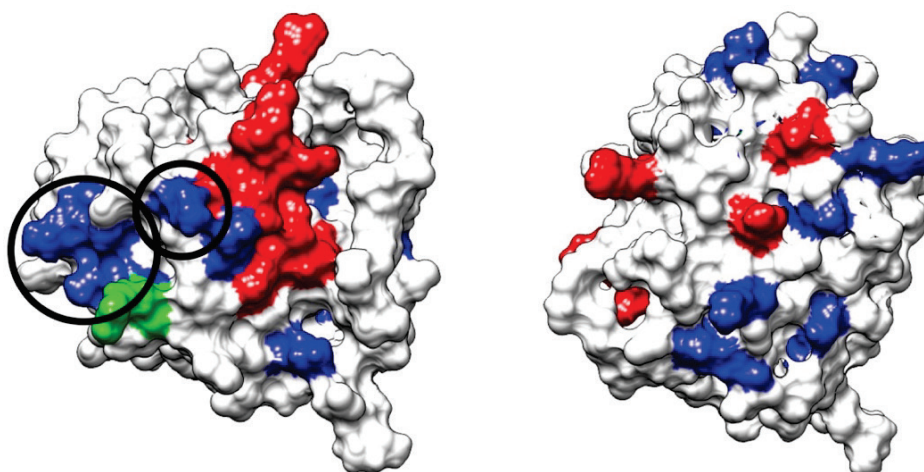


Abb. 4-56: Links: Vorderansicht von FGF-2. Rechts: um 180° rotiertes FGF-2. Die Rezeptorbindestelle (rot) und Heparinbindestelle (grün) im FGF-2 sind auf Basis der PDB-Daten von 1BLA eingezeichnet.⁽¹⁸²⁾ Die Lysinreste sind blau dargestellt. Der an der Rezeptorbindung beteiligte Lysinrest ist schwarz eingekreist. Der größere schwarz umrahmte Bereich zeigt die Heparinbindestelle, die zum Großteil aus Lysinen besteht.

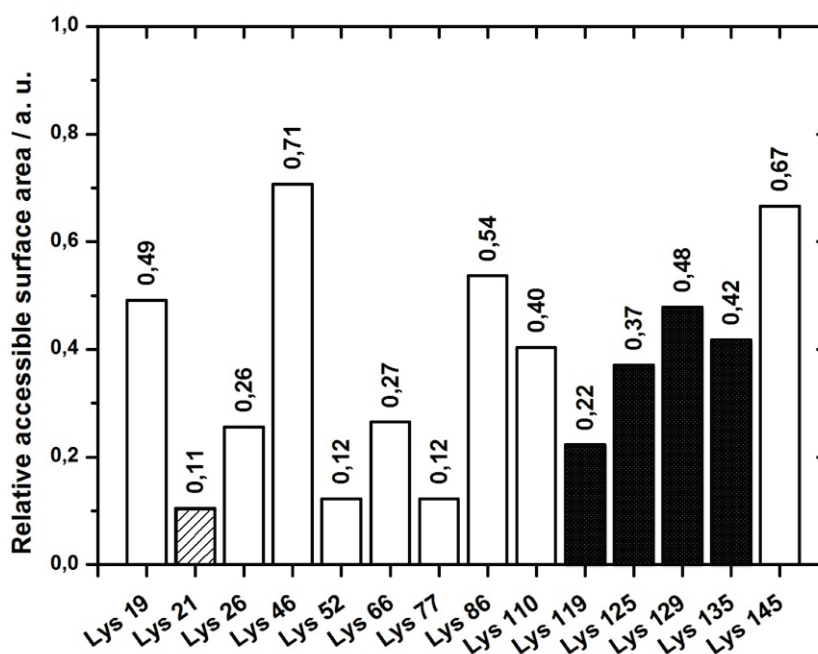


Abb. 4-57: Lösungsmittelzugänglichkeit (RSA) von Lysinresten im FGF-2. Die in die Rezeptorbindung involvierten Lysinreste sind schraffiert, die an der Heparinbindung beteiligten Reste schwarz dargestellt. Die größte Zugänglichkeit für das Biotinylierungsreagenz besteht demnach an Resten, die weder an der Rezeptor- noch an der Heparinbindung beteiligt sind. Der Lysinrest K₂₁, der z. T. an der Rezeptorbindung beteiligt ist, ist von allen Lysinresten am schlechtesten für das Biotinylierungsreagenz zugänglich.

Biotinylierung in Anwesenheit von Heparin

Da eine Biotinylierung an der Heparinbindestelle nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, wurde ein Biotinylierungsansatz generiert, bei dem die Heparinbindestelle während der Biotinylierung mit Heparin abgesättigt wurde. Eine Detektionsreaktion mit Streptavidin-HRP, bei der biotinylierte Proteine auf einer Cellophanmembran markiert wurden, zeigte ein Signal für das biotinylierte FGF-2 (Abb. 4-58).

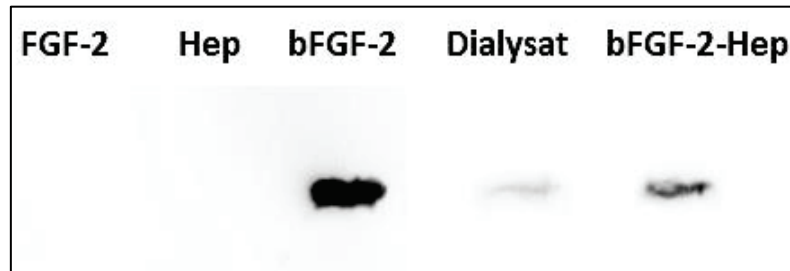


Abb. 4-58: Detektion biotinylierter Moleküle mit Streptavidin-HRP. Die ersten beiden Spuren sind Negativkontrollen von nicht-biotinylierten FGF-2 und Heparin. Spur 3 ist eine Positivkontrolle eines biotinylierten FGF-2-Wachstumsfaktors. In Spur 4 ist das letzte Dialysat nach der Aufreinigung aufgetragen. Auch hier ergibt sich ein schwaches Signal. Die letzte Spur zeigt, dass der bFGF-2-Heparin-Komplex ebenfalls biotinyliert vorliegt.

Allerdings ist auch eine Bande des Dialysats nach dem letzten Aufreinigungsschritt sichtbar. Das Dialysat besteht aus allen Molekülen, die ein Molekulargewicht < 10 kDa haben. Das hier eingesetzte Heparin war ein Oligomer mit einem MW von 3.5 kDa, welches daher in der Dialyse ebenfalls entfernt wurde. Da freies Biotin im Dialysat nicht nachgewiesen werden konnte, stammt das Signal entweder vom FGF-2 oder vom Heparin.

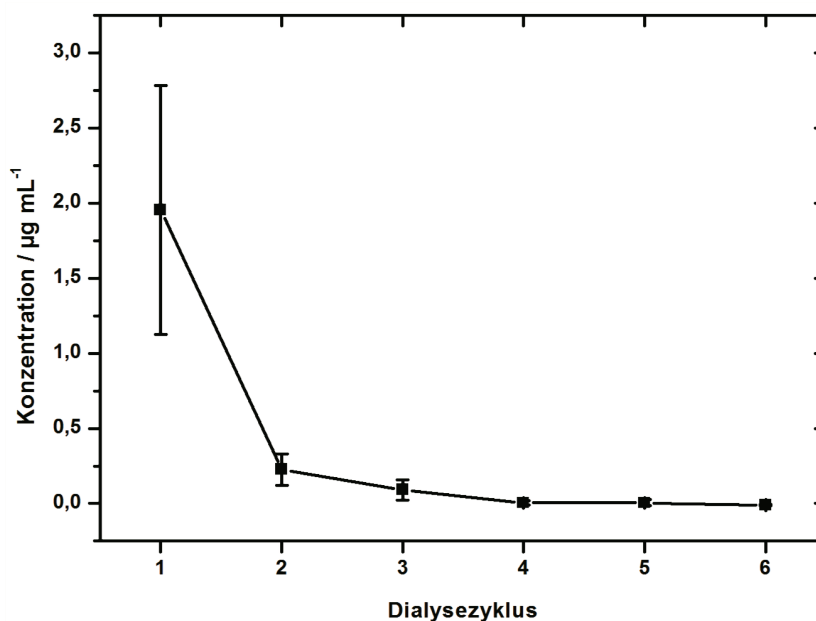


Abb. 4-59: Nachweisbare Konzentration des Eluats nach Dialyse biotinierter Moleküle, welches mittels BCA detektiert wurde. Ab dem 4. Dialysezyklus ist kein Eluat mehr nachweisbar.

Allerdings dürfte dann im 8. Dialysezyklus kein nachweisbares biotinyliertes Heparin vorhanden sein, denn in vorhergehenden Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass ab dem 4. Dialysezyklus kein Eluat mehr nachweisbar ist (Abb. 4-59). Die Bande ist aber deutlich sichtbar. Laut Herstellerangaben besitzt das Heparin Dodekamer keine primären Aminogruppen, an denen das Biotinylierungsreagenz angreifen könnte. Allerdings wurde vom Hersteller eingeräumt, dass die Grenze im Aufreinigungsprozess 75 % beträgt. Daher ist es möglich, dass die einzelnen Disaccharideinheiten variieren können und ein Teil der Heparinmoleküle doch ein primäres Amin besitzt. Dies könnte dann während der Biotinylierungsreaktion ebenfalls biotinyliert werden. Möglicherweise löst sich durch die Vielzahl an Dialysezyklen die Bindung von Heparin an das FGF-2, welches dann in den späten Dialysezyklen detektiert werden kann. Dann könnte auch nur das Heparin biotinyliert vorliegen und der Wachstumsfaktor nicht. Es lässt sich daher nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob der Wachstumsfaktor, das Heparin oder sogar beide Moleküle biotinyliert vorliegen.

Biotinylierung in Abwesenheit von Heparin

Die Biotinylierung von FGF-2 ohne Schutz der Heparinbindestelle erfolgte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin. Der qualitative Erfolg der Biotinylierung wurde mit einer Detektionsreaktion durch Streptavidin-HRP geprüft. Abb. 4-60 zeigt, dass nur das biotinylierte FGF-2 ein Signal liefert. Der Biotinylierungsgrad wurde nicht

zusätzlich bestimmt. Aus den Simulationen und Ergebnissen des vorherigen Abschnitts kann bei einem geringen Biotinüberschuss von 10 geschlossen werden, dass kein die Rezeptorbindung beeinträchtigender Lysinrest biotinyliert wurde.



Abb. 4-60: Detektion von biotinyliertem FGF-2 (bFGF-2) mit Streptavidin-HRP. Die Kontrolle (FGF-2) zeigte kein Signal.

Biotinylierung und Quantifizierung von Heparin

Die Biotinylierung von Heparin ($M_w \approx 15000 \text{ g mol}^{-1}$) erfolgte unter vorheriger Aktivierung durch Carbodiimidchemie mit Sulfo-NHS-LC-Biotin. Da nicht zusätzlich nachgewiesen wurde, ob das Heparin frei von primären Aminogruppen war, wurde eine Biotinylierung mit Alkoxyamin-PEG₄-Biotin durchgeführt. Nach der Aufreinigung durch Zentrifugationsdialyse wurde das biotinylierte Heparin zusammen mit einer nicht-biotinylierten Kontrolle auf eine Celluphanmembran pipettiert und nach Blocken der Membran mit 5 % BSA eine Detektionsreaktion mit Streptavidin-HRP durchgeführt. In Abb. 4-61 ist zu sehen, dass nur biotinyliertes Heparin ein Signal liefert. Interessanterweise ist eine Biotinylierung über beide Biotinylierungsmethoden möglich. Demnach beinhaltet das verwendete Heparin entgegen den Herstellerangaben freie Aminogruppen. Dies vereinfacht die Prozedur der Biotinylierung in zukünftigen Untersuchungen, da die Aktivierung der Carboxylgruppen durch Carbodiimide entfällt. Diese Biotinylierung erhält zudem die natürliche Ladungsverteilung im Heparin. Heparin ist durch die vielen Carboxylgruppen und Sulfatierung stark negativ geladen, worin auch die biologische Aktivität begründet liegt. Durch die Biotinylierung an Carboxylgruppen kann möglicherweise die Ladungsverteilung beeinträchtigt werden. Dies wiederum kann die biologische Aktivität, die auf Ladungswechselwirkung mit z. B. FGF-2 beruht, negativ beeinflussen. Aus diesem Grund ist eine Biotinylierung an Aminogruppen für zukünftige Untersuchungen vorzuziehen.

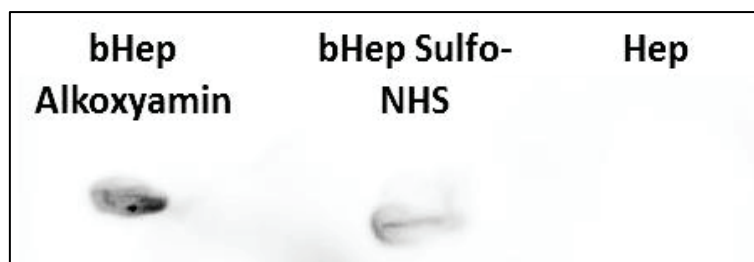


Abb. 4-61: Detektionsreaktion von biotinyliertem Heparin mit Streptavidin-HRP. Unabhängig davon, ob Heparin mit PEG₄-Alkoxyamin oder Sulfo-NHS-LC-Biotin biotinyliert wurde, zeigten beide ein spezifisches Signal im Vergleich zur nativen Negativkontrolle (Hep).

Freies Biotin kann mit dieser Nachweisreaktion nicht detektiert werden. Daher wurde als weitere Kontrolle mit einem HABA-Assay die Konzentration in der letzten Probe des Dialysats untersucht. Der Assay ergab eine Konzentration von 26.7 pM an freiem Biotin nach dem 5. Dialysezyklus. Wenn in der biotinylierten Probe noch diese Menge an freiem Biotin vorhanden ist, hat dies keinen messbaren Einfluss auf die Anbindung an einen Streptavidinmonolayer. Wird ein Volumen von 1 mL in die Messzelle gegeben, enthält die Lösung ca. 2.67×10^{-14} Mol Biotin. Bei einem Bedeckungsgrad von Streptavidin mit ca. 80 % sind etwa 3.7×10^{-12} Mol Streptavidin gebunden, die jeweils zwei Biotin binden könnten. Damit können durch das freie Biotin maximal 1.5 % der vorhandenen Bindungsplätze belegt werden. Dies reicht bei weitem nicht aus, um die Adsorption einer biotinylierten Probe signifikant zu beeinträchtigen.

Die Quantifizierung von Heparin erfolgt standardmäßig aufwändig mit kolorimetrischer Bestimmung oder Titration.⁽²⁹⁵⁾ Für die Quantifizierung in dieser Arbeit wurde eine FTIR-basierte Methode entwickelt, bei der 50 µL der Heparinlösung in die AquaSpec-Messzelle injiziert und über den Bereich von 1315 – 1080 cm⁻¹ integriert wurden (Abb. 4-62). Die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung lag bei ± 0.02 mg mL⁻¹.

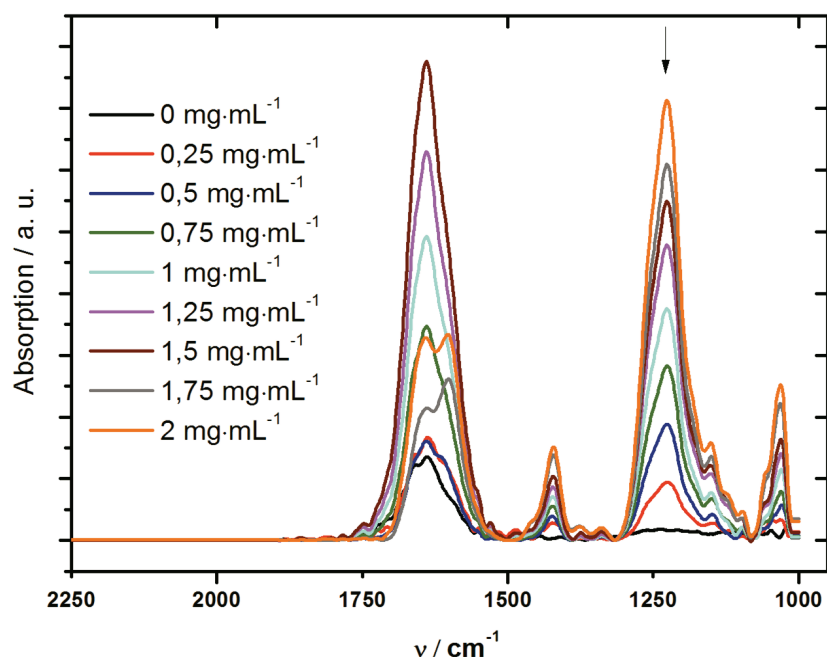


Abb. 4-62: Heparin-Standardreihe im FTIR. Die Bandenintensität im Bereich $1315 - 1080 \text{ cm}^{-1}$ steigt nach Normierung proportional zur eingesetzten Konzentration; in der Bande im Bereich $1750 - 1480 \text{ cm}^{-1}$ ist dagegen keine Korrelation mit der Konzentration zu erkennen.

4.4.2 Immobilisierung von bFGF-2 auf dem molekularen Schichtsystem

Immobilisierung des bFGF-Heparin-Komplexes

Die Bindung des biotinylierten bFGF-Heparin-Komplex entsprechend Abb. 3-7 auf einen Streptavidinmonolayer erfolgte zweistufig. Zuerst wurde der bFGF-Heparin-Komplex auf den Monolayer adsorbiert, anschließend eine weitere Lage FGF-2, die über die Heparinbindestelle an das Heparin binden kann. Die Messung wurde jeweils in zwei gesonderten Kinetiken im SPR in Echtzeit verfolgt. Als Kontrollen wurde die unspezifische Adsorption von Heparin und FGF-2 an den Streptavidinmonolayer getestet.

Abb. 4-63 zeigt, dass der bFGF-2-Heparin-Komplex spezifisch an den Streptavidinmonolayer bindet. Auch die Bindung des zweiten Layers mit FGF-2 Molekülen an den immobilisierten bFGF-Hep-Komplex konnte in Echtzeit beobachtet werden. Nach Fresnel-Fitting der adsorbierten Layer ergab sich eine Schichtdicke von 0.6 nm (entspricht 19% Bedeckungsgrad und 34 ng cm^{-2}). Im Verlauf einer Langzeitmessung stellte sich jedoch heraus, dass das Schichtsystem so nicht stabil blieb und sich ablöste. Die Kontrollen zeigten, dass weder Heparin noch FGF-2 stabil an den Streptavidinmonolayer binden können.

Somit bewährte sich dieser Ansatz für weiterführende Untersuchungen nicht und wurde in den Zellkulturexperimenten nicht berücksichtigt.

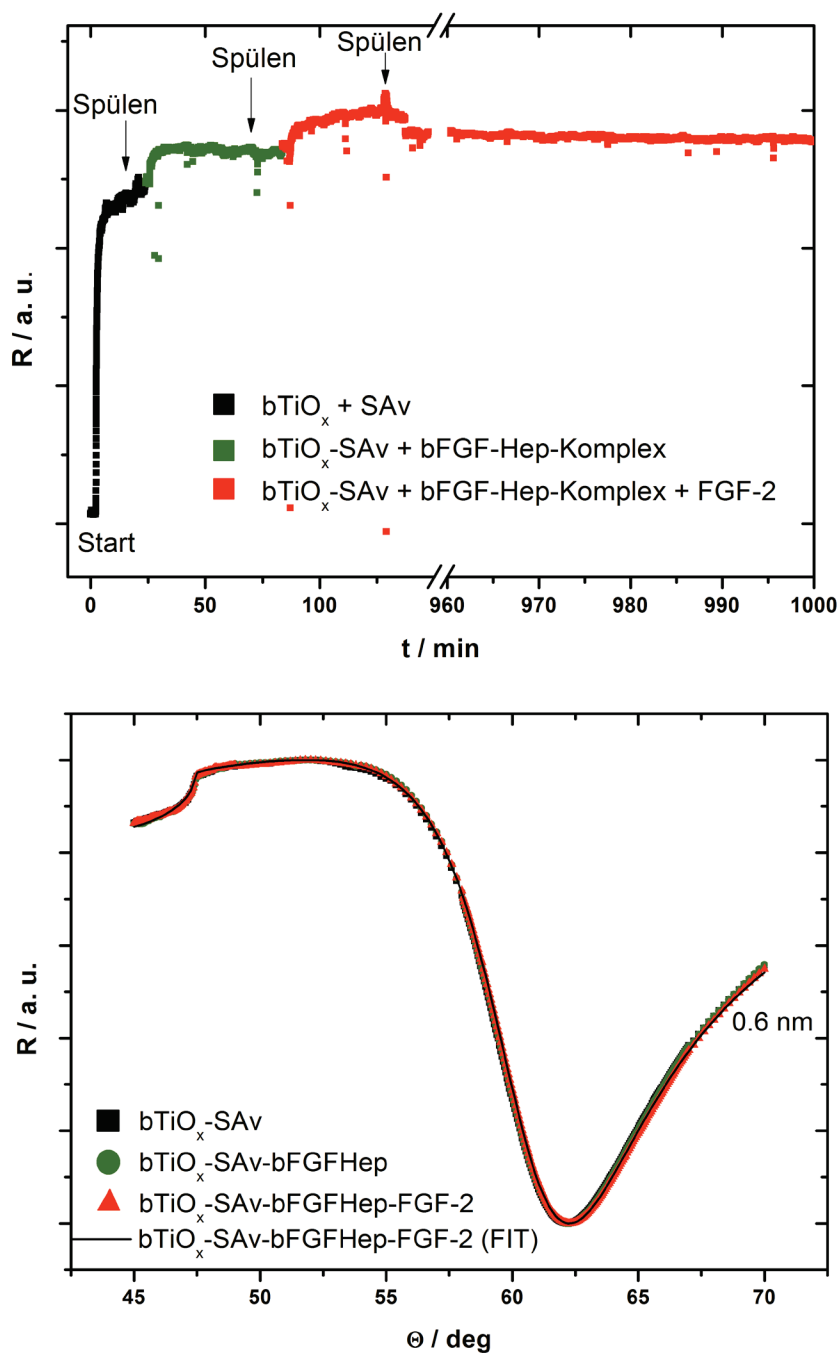


Abb. 4-63: Oben: Bindung des bFGF-2-Hep-Komplexes an die Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x-Oberfläche (schwarz) mit darauf folgender Immobilisation des FGF-2. Die anschließend durchgeführte Langzeitmessung zeigte die Instabilität der Bindung des Komplexes. Unten: Die SPR-Scans der Oberfläche bei Adsorption des bFGF-Hep-FGF-2-Komplexes.

Immobilisierung von bFGF ohne Heparin

Das FGF-2 wurde ohne Heparin biotinyliert und entsprechend Abb. 3-8 auf die Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x -Schicht gegeben. Während die unspezifische Adsorption des nicht-biotinylierten FGF-2 nicht stabil auf der Oberfläche blieb, konnte mit dem biotinylierten FGF-2 ein geringer Schichtdickenzuwachs beobachtet werden (Abb. 4-64). Nach Fitting des SPR-Scans vor und nach der Inkubation mit bFGF ergab sich eine Schichtdicke von 1 nm für bFGF-2.

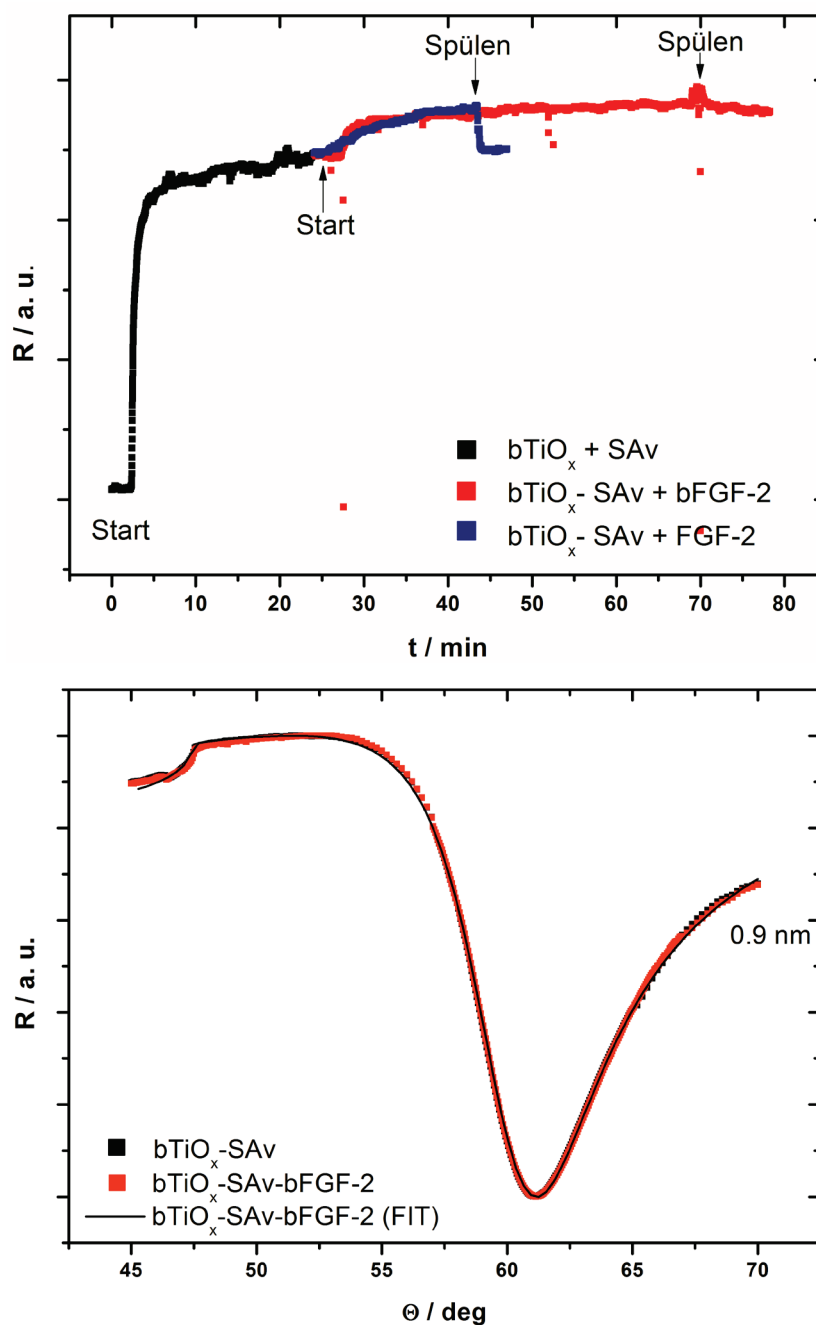


Abb. 4-64: Oben: Kinetik in Echtzeit der Adsorption von bFGF (rot) und FGF-2 an eine Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x -Oberfläche. Unten: SPR-Scans der Oberfläche vor und nach der Adsorption von bFGF-2.

Unter der Annahme der Dimensionen von FGF-2 mit $3 \times 3 \times 3.1 \text{ nm}^3$ (LxBxH) entspricht dies einem Bedeckungsgrad von etwa 32 %.^{(296),(297)} Es können vom Platzbedarf her theoretisch zwei bFGF-2-Moleküle an Streptavidin binden. Daraus ergibt sich nach der in Abschnitt 4.3.3 aufgestellten Gleichung 4-3 eine Oberflächendichte von ca. 55 ng cm^{-2} . Nach Untersuchungen von Miller et al. liegt diese Menge an FGF-2 deutlich über dem minimalen Stimulationspotential von 1.4 ng cm^{-2} an FGF-2.⁽²⁹⁸⁾

Die Adsorption von bFGF-2 funktionierte nur nach Konjugation von NHS-PEG₁₂-Biotin. Andere, kürzere oder hydrophobere Linker führten zu keiner Adsorption an das Schichtsystem, obwohl ihre Biotinylierung per Detektionsreaktion nachgewiesen werden konnte. Selbst ein kommerziell verfügbarer, biotinylierter FGF-2-Wachstumsfaktor konnte nicht an das Schichtsystem binden. Dieser wurde nach Herstellerangaben mit einem 1.3 nm langem Spacer biotinyliert. Dies scheint für eine Bindung in die tiefe Streptavidin-Bindungstasche zu kurz, wenn das Biotin nicht optimal orientiert ist. Denn auf einer Oberfläche ist die Bindungsaffinität von Biotin zu Streptavidin nicht so stark wie in Lösung, da nur ein Bindungspartner Translation und Rotation ausführen kann. Dies kann als Erklärung herangezogen werden, weshalb in der Detektionsreaktion das HRP-gekoppelte Streptavidin an die biotinylierten FGF-2-Moleküle binden konnte, auf einer Streptavidin-biofunktionalisierten Oberfläche hingegen nicht. Es wird darüber hinaus für längere Spacer wie Sulfo-NHS-LC-Biotin vermutet, dass in Lösung möglicherweise die hydrophoben Bereiche des Linkers mit hydrophoben Bereichen auf dem FGF-2 wechselwirken und so die Biotin-Streptavidin-Bindung verhindern. Das FGF-2 besitzt auf seiner Oberfläche hydrophobe Stellen – da allerdings nicht nachgewiesen wurde, an welchen Lysinrest das Biotin konjugiert wurde, kann diese Fragestellung nicht abschließend beantwortet werden.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde für weitere Konjugationsreaktionen an FGF-2 nur noch der NHS-PEG₁₂-Biotinlinker verwendet. Bei dieser Art der Biotinylierung kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass auch Lysinseitengruppen der Heparinbindestelle biotinyliert werden, jedoch ist nach Pieri et al. erst ab einem molaren Überschuss von > 200 des Biotinylierungsreagenzes mit einer Einschränkung der biologischen Aktivität von bFGF-2 zu rechnen. Biotinylierte FGF-2-Moleküle, die mit molaren Überschüssen des Biotinreagenzes

von bis zu 200 inkubiert wurden, zeigten in Untersuchungen von Pieri et al. weder eine Einschränkung der Affinität zu Heparin noch zum FGF-Rezeptor.⁽²⁹⁹⁾

Immobilisierung von biotinyliertem Heparin und elektrostatischer Physisorption von FGF-2

Nach Injektion des biotinylierten Heparins (bHep) entsprechend Abb. 3-9 auf eine Streptavidin-biofunktionalisierte TiO_x-Oberfläche, konnte eine rasche Adsorption in der Echtzeitkinetik beobachtet werden. Es trat bereits innerhalb von 10 min nach Zugabe eine Sättigung der Oberfläche mit bHep auf. Auch die anschließende elektrostatische Immobilisation von FGF-2 an das Heparin resultierte in einem sichtbaren Anstieg des Reflektionssignals (Abb. 4-65). Ein Fresnel-Fit der SPR-Scans ergab eine Schichtdicke von 0.2 nm für bHep und 0.8 nm für FGF-2. Dies entspricht einem FGF-2 Bedeckungsgrad von 25.8 % und einer Oberflächendichte von ca. 40 ng cm⁻². Eine Langzeitkinetik über Nacht zeigte allerdings ein Abfall des Reflektivitätssignals bis auf den Wert nach Applikation des bHep. Dies bedeutet, dass die Bindung von FGF-2 an das Heparin nicht stabil genug ist, um es über einen längeren Zeitraum an die Oberfläche zu koppeln.

Der Ansatz bietet allerdings auch Vorteile: Wenn immobilisiertes bFGF-2 auf einem Streptavidinmonolayer die Zellen nicht stimulieren kann, bestünde damit die Möglichkeit der zeitnahen Freisetzung von FGF-2 in der Nähe der Zellen. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus einem Polymer ist eine vielfach angewandte Form des Drug Delivery.⁽³⁴⁾

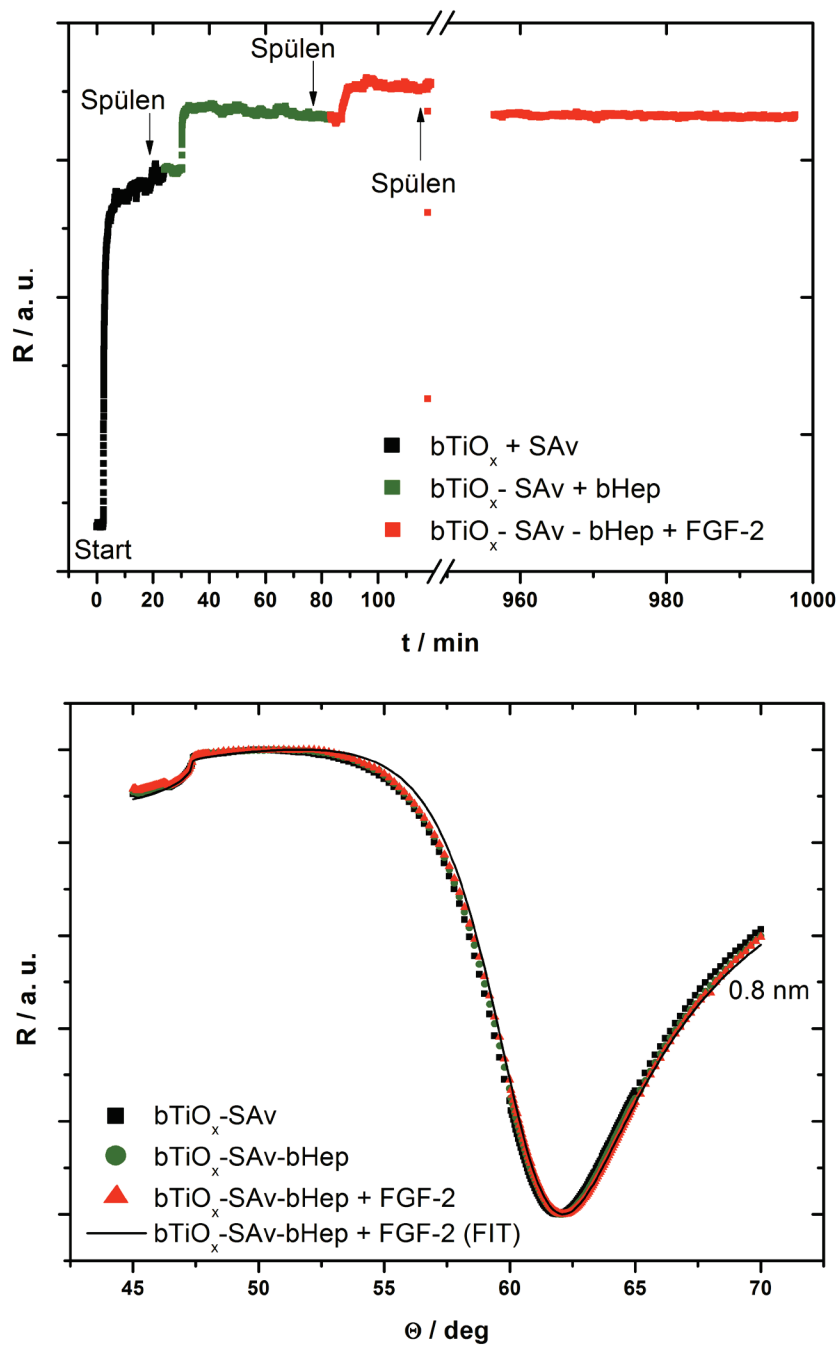


Abb. 4-65: Oben: Echtzeit-Kinetik der Immobilisation von biotinyliertem Heparin (schwarz) und FGF-2 (rot). Beide Moleküle sind innerhalb kurzer Zeit spezifisch auf der Oberfläche immobilisiert, jedoch diffundiert das FGF-2 im Verlauf von mehreren Stunden von der Oberfläche zurück in das Medium. Unten: Die SPR-Scans direkt nach Aufbau des Schichtsystems auf biotinyliertes Titanoxid (bTiO_x).

4.4.3 Effekte von immobilisiertem bFGF-2 auf humane Fibroblasten

Zellwachstum

Die Anzahl der über einen Zeitraum von 24 h auf den Oberflächen gewachsenen Zellen wurden als Maß für ihre Adhäsions- und Proliferationsfähigkeit verwendet. Dabei zeigte sich für die humane Fibroblastenzelllinie, dass das Wachstum auf Oberflächen mit immobilisiertem FGF-2 signifikant verstärkt ist (Abb. 4-66 und Abb. 4-67). Sowohl auf den mit bFGF auf Streptavidin als auch den mit biotinyliertem Heparin und FGF-2 biofunktionalisierten Oberflächen lag die Zellzahl signifikant höher als auf unbeschichteten bzw. antiadhäsiv biofunktionalisierten Oberflächen. Auf der Positivkontrolle mit FGF-2 im Medium wuchsen die Zellen erwartungsgemäß ebenfalls besser als auf TiO_x allein, aber nicht so gut wie auf Oberflächen mit dem immobilisierten Wachstumsfaktor. Oberflächen, die mit bBMP-2 biofunktionalisiert waren, zeigten keinen verstärkenden Effekt auf das Wachstum der Fibroblasten.

Für die Osteoblastenzelllinie zeigte sich kein verstärkender Effekt der immobilisierten FGF-2-Varianten auf das Wachstumsverhalten (Abb. 4-66 und Abb. 4-67). Das Wachstum dieser Zellen war vergleichbar mit dem auf den Negativkontrollen (TiO_x , b TiO_x -Streptavidin). Der immobilisierte Wachstumsfaktor bBMP-2 sowie das in Lösung zugegebene BMP-2 zeigten eine signifikante Verstärkung des Zellwachstums. Dieses Ergebnis ist damit in Übereinstimmung mit den unter 4.3.5 beschriebenen Beobachtungen.

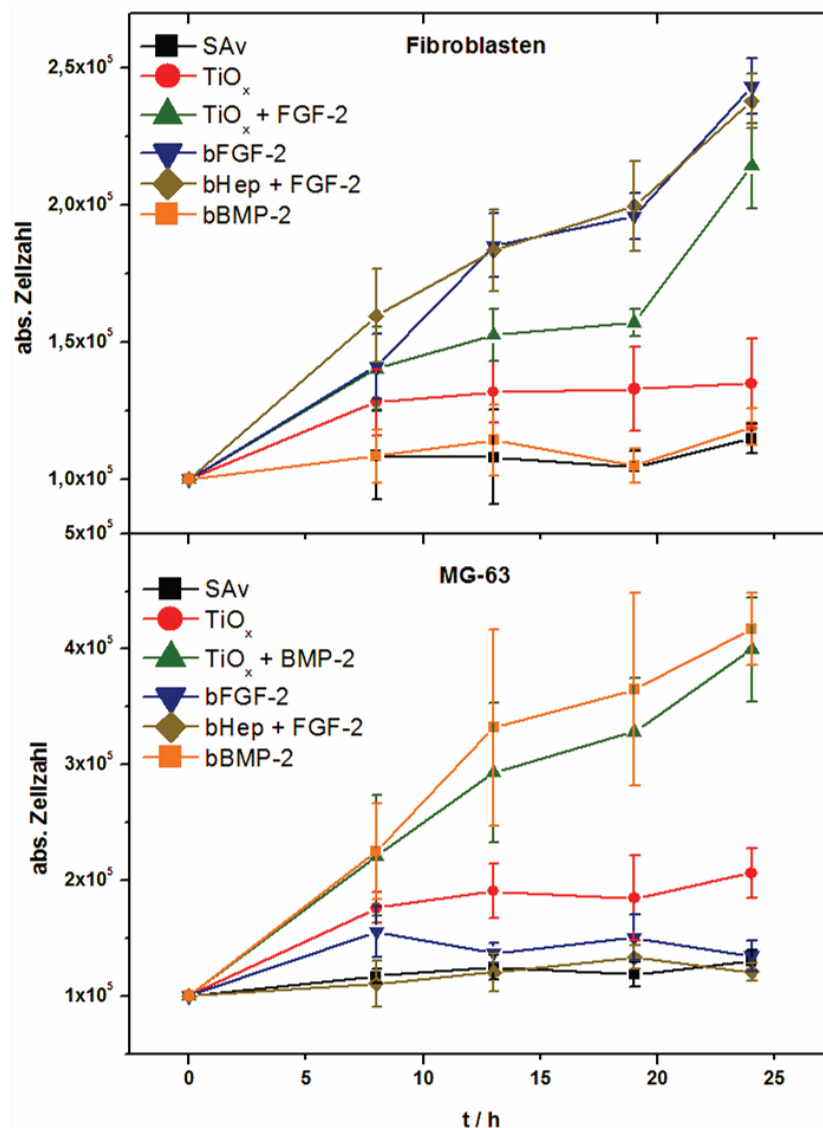


Abb. 4-66: Zellwachstum von humanen Osteoblasten (MG-63) und humanen pulmonaren Fibroblasten auf verschiedenen biofunktionalisierten Oberflächen. SAV: Streptavidin auf TiO_x; TiO_x: keine Biofunktionalisierung; TiO_x + FGF-2/BMP-2: Positivkontrolle mit Wachstumsfaktor im Medium; bFGF-2/bBMP-2: Auf Streptavidin quasi-kovalent immobilisierter Wachstumsfaktor; bHep + FGF-2: biotinyliertes Heparin an Streptavidin mit physisorbierten FGF-2. Die quasi-kovalent immobilisierten Wachstumsfaktoren zeigten zusammen mit den Positivkontrollen das stärkste Zellwachstum.

Die Ergebnisse für das Zellwachstum der Fibroblastenzelllinie zeigten, in Übereinstimmung mit anderen Ansätzen aus der Literatur, eine signifikante Stimulation des Fibroblastenwachstums durch solubilisierendes FGF-2 (sFGF-2) im Kulturmedium gegenüber Fibroblasten, die nur auf TiO_x oder bTiO_x-Streptavidin wachsen. Dadurch wird die Verbesserung von Implantatoberflächen durch zelltypspezifische Biofunktionalisierung weiter untermauert. Es bestätigt sich die eingangs aufgegriffene These, dass das FGF-2 auch ohne Heparin als Cofaktor biologisch aktiv ist. Das verstärkte Zellwachstum auf bFGF-biofunktionalisierten TiO_x-Oberflächen ist dagegen eine innovative Erkenntnis.

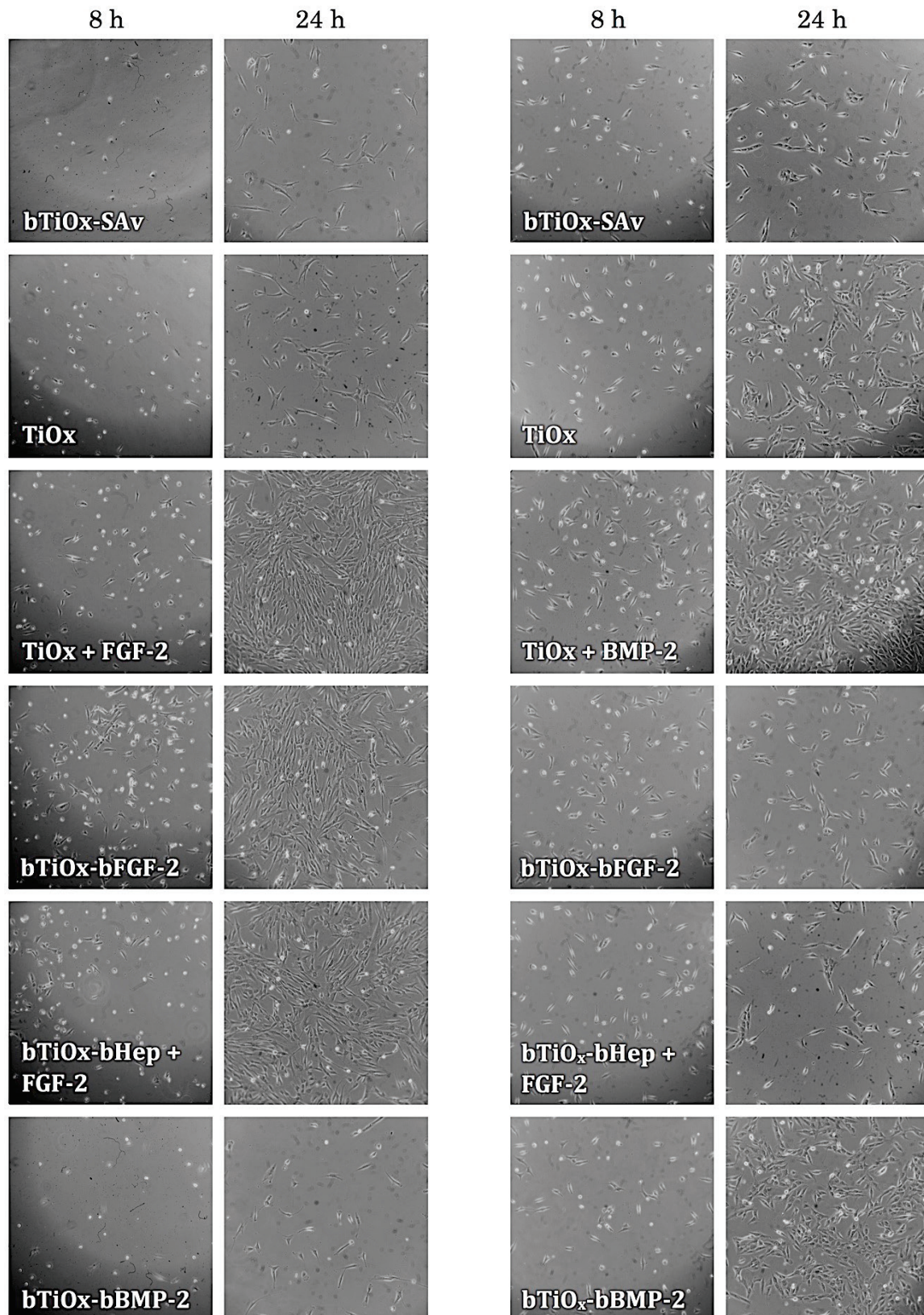


Abb. 4-67: Zellwachstum nach 8 und 24 h von humanen pulmonaren Fibroblasten (linke Doppelspalte) und MG-63 (rechte Doppelspalte) auf verschieden biofunktionalisierten Substraten. Obere Reihe: Antiadhäsive Biofunktionalisierung von TiO_x mit Streptavidin. 2. Reihe: Natives TiO_x . 3. Reihe: Natives TiO_x , FGF-2/BMP-2 wurde in Lösung zugegeben. 4. Reihe: Biotinyliertes FGF-2 auf bTiO_x-SAv. 5. Reihe: Biotinyliertes Heparin mit elektrostatisch adsorbiertem FGF-2 auf bTiO_x-SAv. 6. Reihe: Biotinyliertes BMP-2 auf bTiO_x-SAv.

Aus Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen ist bereits bekannt, dass viele Wachstumsfaktoren auch immobilisiert auf einer Oberfläche ihre biologische Aktivität ausüben können, solange die Bindung an den Rezeptor nicht abhängig von einer Internalisierung des Wachstumsfaktors ist.^{(24),(32),(33)} Diese Aussage ist mittlerweile bereits soweit erweitert worden, dass die biologische Aktivität bei allen immobilisierten Wachstumsfaktoren bestehen bleibt, die eine Heparinbindestelle besitzen.⁽³⁰⁰⁾ Für FGF-2 wurde bereits in Arbeiten von Nur-E-Kamal et al. und Moon et al. gezeigt, dass kovalent immobilisiertes FGF-2 biologisch aktiv ist und sogar ein stärkeres Stimulationspotential auf Fibroblasten besitzt als der solubilisierter Wachstumsfaktor alleine.^{(300),(301)} Für den biotinylierten FGF-2-Wachstumsfaktor bestand diese Erkenntnis bisher nicht. Aus den Zellzahlen lässt sich aber eine ähnliche Aussage vermuten. So sind die Zellzahlen bei bFGF-2 und bHep-FGF-2 zu allen Zeitpunkten höher als in der Positivkontrolle mit sFGF-2, wenn auch im Rahmen der Standardabweichung nicht signifikant. Der gleiche Effekt konnte auch bei der Stimulation der humanen Osteoblasten (MG-63) durch bBMP-2 und gelöstes BMP-2 (sBMP-2) beobachtet werden. Auch dies ist in guter Übereinstimmung mit bisherigen Forschungsergebnissen anderer Gruppen.^{(29),(45),(65)} Als Ursache werden hierfür eine höhere lokale Konzentration sowie eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen diskutiert.^{(32),(300)} Die Wachstumsfaktoren haben in ihrer solubilisierter Form nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten bis Stunden. Gebunden an Heparin erhöht sich die Stabilität erheblich auf einige Tage,⁽¹⁰¹⁾⁽³⁰²⁾ aber auch ohne Heparin ist der Wachstumsfaktor geschützt, wenn er auf der Oberfläche gebunden ist.

Diese Tatsache ist auch zur Erklärung der starken Stimulation von bHep + FGF-2 auf Fibroblasten hilfreich: Das FGF-2 ist elektrostatisch an das Heparin adsorbiert und dort geschützt. Wird es langsam ins Medium abgegeben, oder binden Fibroblasten an die Heparin-FGF-2-Oberfläche, kann eine Stimulation stattfinden. Aus der Langzeitkinetik eines solchen Multilayers war ersichtlich, dass das elektrostatisch gebundene FGF-2 innerhalb von 15 h ins Medium abgegeben wurde. Demzufolge konnte auch hier eine konstante Stimulation über 15 h erfolgen. Da vielfach berichtet wurde, dass die Bindung von Heparin als Cofaktor die Stimulation verstärkt,^{(89),(94),(95)(87)} kann dies ebenfalls als eine mögliche Erklärung für die stärkere Stimulation als in der Positivkontrolle herangezogen werden. Zieht man die in Abschnitt 4.4.2 diskutierten Oberflächendichten von FGF-2 hinzu, zeigt sich für FGF-2 auf Heparin eine etwa 30 % geringere Oberflächendichte. Trotzdem sind die

Effekte vergleichbar mit denen von bFGF-2. Dies spricht für eine Verstärkung der biologischen Aktivität durch das Heparin.

Im Kontext der Biofunktionalisierung eines Implantats für die gleichzeitige Stimulation des gingivalen Zellwachstums und des Knochenwachstums ist diese parallel durchgeführte Studie richtungsweisend. Es konnte die selektive Stimulation der Zellen des entsprechenden Gewebes mit dem spezifischen Wachstumsfaktor gezeigt werden. Immobilisiertes bBMP-2 zeigte in dieser Studie keinen positiven Einfluss auf das Wachstum der humanen Fibroblasten, entsprechend zeigte sich auch kein Einfluss des immobilisierten FGF-2 auf humane Osteoblasten. Dieses Ergebnis ermöglicht das Design multifunktionaler Implantate, die durch Immobilisation verschiedener Signalmoleküle selektive Stimuli erzeugen können. Dies könnte in zukünftigen Applikationen auch Implantate verbessern, die an anderen Grenzflächen eingebaut werden und mit verschiedenen Zelltypen in Kontakt kommen.

Die gegenseitige Stimulation von Fibroblasten durch BMP-2 und von Osteoblasten durch FGF-2 wird kontrovers diskutiert, es existieren sowohl Belege dafür als auch dagegen.^{(303)–(305)} In der vorgestellten Studie konnte kein *crosstalk* der verschiedenen Signalwege in beiden Zelllinien durch BMP-2 und FGF-2 festgestellt werden. In Abschnitt 4.3.5 wurde bereits der potentielle *crosstalk* zwischen BMP-2- und Fibronectin-stimulierten Signalwegen diskutiert. Ein solcher *crosstalk* der Signaltransduktionswege ist auch von FGF-2 auf osteoblastäre Vorläuferzellen und von BMP-2 auf Fibroblasten bekannt,^{(306),(307)} jedoch scheint er bei bereits differenzierten Osteoblasten- und Fibroblastenzellen wie in dieser Studie auf das Zellwachstum einen vernachlässigbaren Einfluss zu haben. Trotzdem bleibt diese Fragestellung für zukünftige Untersuchungen offen.

Proliferation

Für die Messung der Proliferation wurde ein CellTiterBlue®-Assay genutzt. Dabei zeigte sich für die Proliferation nach 24 h für beide Zelllinien eine inverse Proportionalität zum Zellwachstum. Die höchsten Proliferationswerte wurden für hPF jeweils auf Streptavidin-biofunktionalisierten TiO_x-Substraten und TiO_x gemessen, für die MG-63-Zelllinie auf Streptavidin, bFGF-2 und bHep + FGF-2. Die niedrigsten Proliferationswerte zeigten sich bei den biofunktionalisierten Oberflächen, die bei der Beobachtung des Zellwachstums die höchsten Zelldichten

aufwiesen (bFGF-2 und die Positivkontrolle für hPF; bBMP-2 und die Positivkontrolle für MG-63).

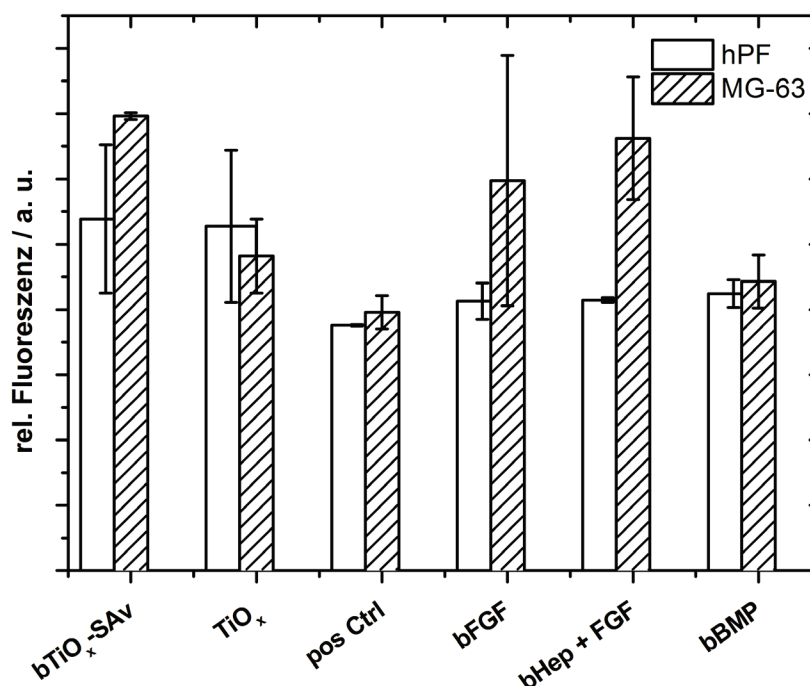


Abb. 4-68: Proliferationsassay der verschiedenen Biofunktionalisierungen nach 24 h. Die Ergebnisse zeigten eine Proliferation der Zellen, die invers zu dem in Abb. 4-66 gezeigten Zellwachstum war. Legende: SAv = TiO_x mit einem Streptavidinmonolayer; TiO_x = natives TiO_x; pos Ctrl = TiO_x + FGF-2 / BMP-2; bFGF = TiO_x-SAv mit biotinyliertem FGF-2; bHep + FGF = TiO_x-SAv mit biotinyliertem Heparin und elektrostatisch adsorbiertem FGF-2; bBMP = TiO_x-SAv mit biotinyliertem BMP-2.

Diese Ergebnisse sind invers zu dem optisch detektierten Zellwachstum und erscheinen widersprüchlich. Tatsächlich kann die Ursache dafür aber einfach darauf zurückgeführt werden, dass der Stoffwechsel bei den optisch stark proliferierenden Zellen nach 24 h bereits heruntergefahren war, da die Zellen kein Platz mehr für weiteren Ausbreitung besaßen. Dieser Platz ist aber auf den Substraten noch vorhanden, die eine optisch geringere Zelldichte aufwiesen und demzufolge keinen eingeschränkten Stoffwechsel hatten. Daher muss das Experimentdesign für diesen Assay angepasst werden und der Zeitpunkt für eine optimale Zelldichte herausgefunden werden. Dies ist dann der Fall, wenn der Stoffwechsel nicht durch andere Parameter wie begrenzte Platzverhältnisse inhibiert werden kann. Erst dann können die Ergebnisse eines Proliferationsassays zur Unterstützung des optisch ermittelten Wachstumsverhaltens herangezogen werden.

4.5 Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat-Modelloberflächen

4.5.1 Charakterisierung ultradünner Calciumphosphat-Modelloberflächen

Die mittels Hochfrequenz-Magnetronsputtering auf LaSFN9 / Si-Substraten aufgetragenen CaP-Schichten betrugen nach Online-Schichtdickenwachstumsüberwachung mit Quartz-Crystal-Microbalance während des Sputterprozesses 5, 10 und 20 nm. Die Schichten wurden mittels REM, IRRAS, AFM, SPR und Ellipsometrie charakterisiert. Dabei ergaben sich bei allen Methoden im Rahmen der Chargenschwankungen für die größte CaP-Schichtdicke vergleichbare Schichtdicken zwischen 17 und 24 nm. Die Ergebnisse der Schichtdickenbestimmungen für die 20 nm Modellschicht ist in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Tabelle 4-5: Schichtdicke der gesputterten CaP-Schicht mit verschiedenen Methoden.

| Methode | Schichtdicke [nm] |
|------------------------------------|--------------------------|
| <i>Quartz-Crystal Microbalance</i> | 20 |
| <i>SPR-Spektroskopie</i> | 17±0.5 |
| <i>Ellipsometrie</i> | 23.5±3.1 |
| <i>Rasterelektronenmikroskopie</i> | 22.2±2.0 |
| <i>Rasterkraftmikroskopie</i> | 23±5.5 |

Der SPR-Scan einer nur mit Gold und einer mit Gold-CaP beschichteten Oberfläche ist in Abb. 4-69 dargestellt. Aus den Fresnel-Fits war ersichtlich, dass die Online-Überwachung mittels Quartz-Crystal Microbalance (QCM) nicht uneingeschränkt verlässlich ist. Die Schichtdicken wichen um einige nm von den Sollwerten (5, 10, 20 nm) ab.

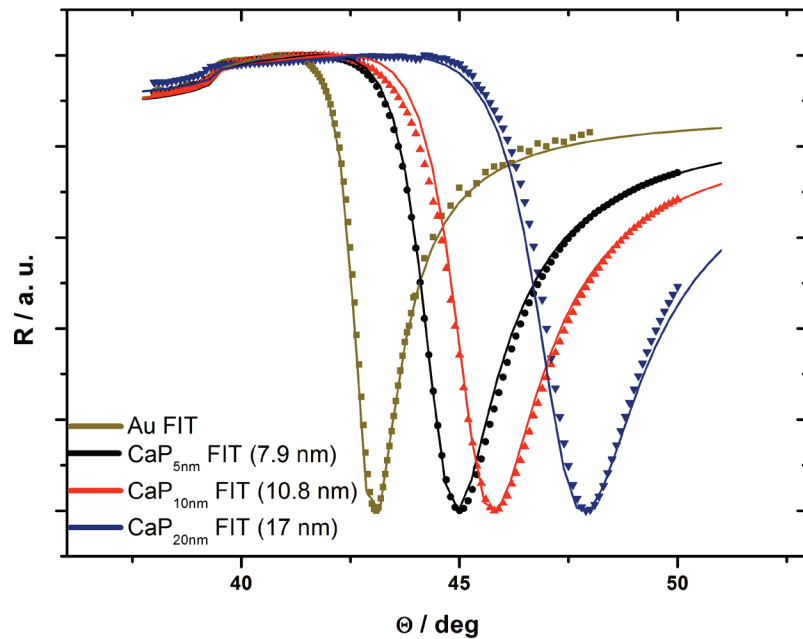


Abb. 4-69: SPR-Scans verschiedener CaP-Schichten mit den Sollwerten 5, 10 und 20 nm. Die mit Fresnel-Fitting der SPR-Scans ermittelten Schichtdicken zeigten 7.9, 10.8 und 17 nm starke CaP-Schichten.

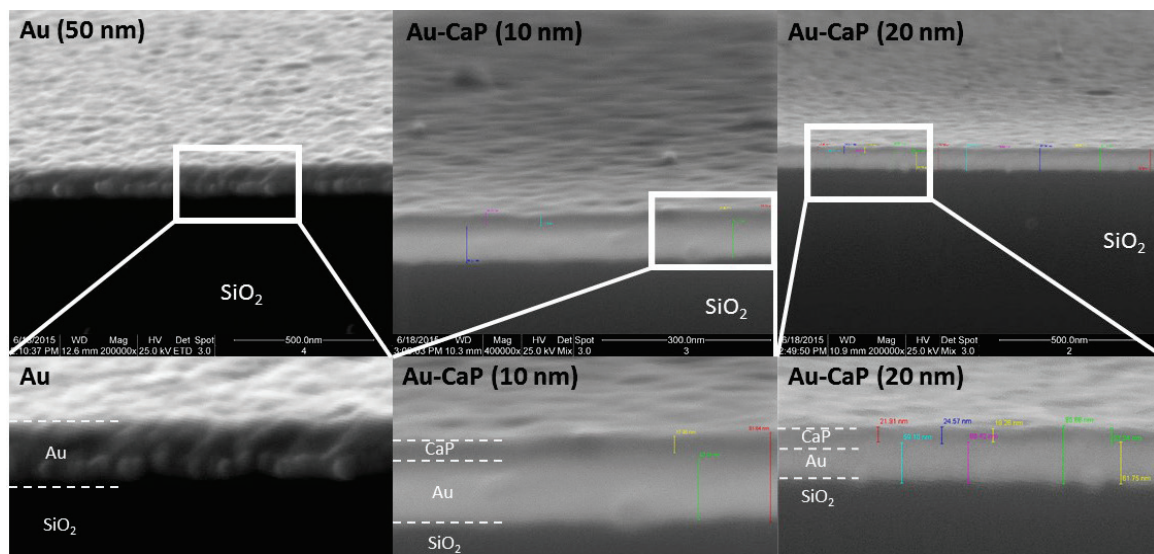


Abb. 4-70: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 50 nm Goldschicht auf Glas (links oben), einer gesputterten CaP-Schicht (10 nm) auf Gold und Glas (Mitte oben) und einer 20 nm CaP-Schicht auf Gold und Glas (rechts oben). Die CaP-Schicht erzeugt einen stärkeren Kontrast als die Goldschicht und kann deshalb als dünne dunkle Schicht auf dem Goldlayer wahrgenommen werden. Unten: Optische Vergrößerung der oberen Bildreihe.

Aus den cross-section-REM-Aufnahmen wurde geschlossen, dass die CaP-Schicht von 20 nm als geschlossene Schicht vorlag (Abb. 4-70). Allerdings schienen chargenabhängig durch den Sputterprozess Poren definierter Größe mit einem Durchmesser von einigen 100 nm auf der Schicht angeordnet zu sein. Die Oberflächenanalyse mittels AFM der CaP-Schicht auf Si-Wafern bestätigte eine

recht homogene Verteilung dieser Poren (Abb. 4-71). Die Defekte können während des Sputterprozesses auf sehr glatten Oberflächen entstehen, indem Restluft in der Vakuumkammer einen Hohlraum unter der gesputterten Schicht erzeugt. Die Schicht kann sich dann an dieser Stelle lösen. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. R. Surmenev wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht.^a

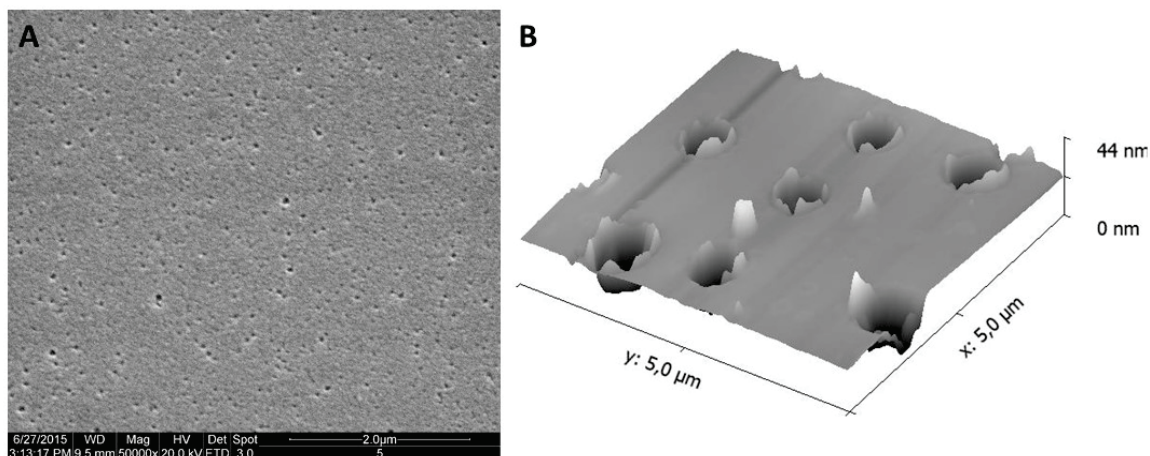


Abb. 4-71: Links: REM-Aufnahme der gesputterten CaP-Oberfläche bei 50 000-facher Vergrößerung. Es sind statistisch verteilt kleine Defekte in der Oberfläche zu sehen. Rechts: AFM-Aufnahme der Probenoberfläche. Hier zeigen sich die Defekte als kleine Krater. Aus der Tiefe der Krater ist eine Schichtdicke des CaP von 22 nm erkennbar.

Der mit Rasterkraftmikroskopie bestimmte RMS-Wert einer 20 nm dicken CaP-Schicht ergab eine Oberflächenrauigkeit von 5.7 nm. Die Bestimmung der Schichtdicke von CaP auf einem Si-Wafer mit Ellipsometrie zeigte eine Schichtdicke von 23.5 ± 3.1 nm von 15 vermessenen Wafern aus unterschiedlichen Chargen. Teilweise war ein Gradient in der CaP-Schichtdicke in eine Richtung des Wafers zu sehen, der auf eine geringe Inhomogenität durch den Sputterprozess hinweist. Übereinstimmend zeigten sich für die Schichtdicke von 20 nm geschlossene, glatte CaP-Schichten, die für eine Charakterisierung mit biophysikalischer Analytik zugänglich sind. Dies ist essentiell, wenn Adsorptionsprozesse im Subnanometerbereich untersucht werden sollen. Für die Sollschichtdicken von 5 und 10 nm konnte nicht zweifelsfrei belegt werden, ob die Schichten geschlossen vorlagen, da die verwendeten Methoden hierbei teilweise an ihre Auflösungsgrenzen gelangten. Daher wurden für alle weiteren Untersuchungen die Chargen mit 20 nm Schichtdicke verwendet.

^a Mündliche Mitteilung vom 09.10.2017

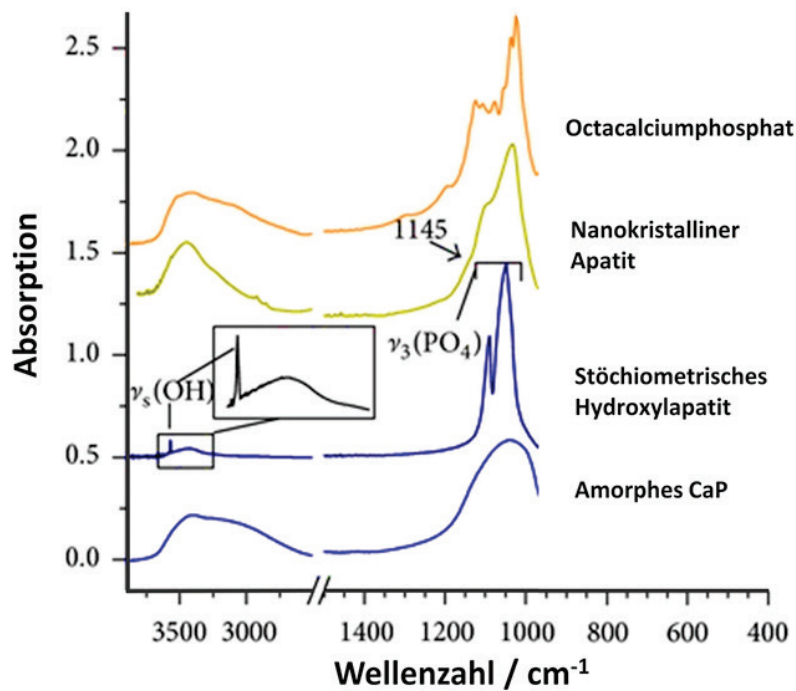
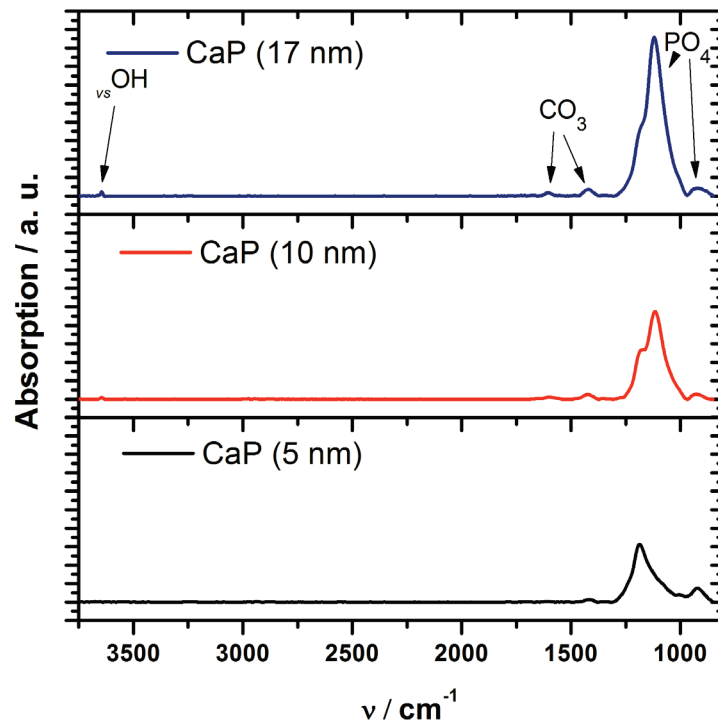


Abb. 4-72: Oben: IRRAS-Spektren der verschiedenen Schichtdicken von CaP-Modellschichten nach Bestimmung der Schichtdicke im SPR. Neben der Phosphatbande waren auch Banden für Carbonat und Hydroxylgruppen sichtbar. Unten: FTIR-Spektren verschiedener Modifikationen von Calciumphosphaten. Das in dieser Arbeit verwendete CaP kommt dem stöchiometrischen Hydroxylapatit sehr nahe. Das Phosphat ist aber teilweise durch Carbonatgruppen substituiert. Modifiziert nach Drouet et al.⁽¹²²⁾

Die verschiedenen Schichtdicken von 5, 10 und 20 nm zeigten im IRRAS eine schichtdickenabhängige Intensität der Phosphatbande bei 1030 – 1100 cm^{-1} und

960 cm⁻¹, die sich nicht wie bei kristallinem HAp aufspaltete. Zusätzlich konnte eine scharfe O-H-Bande (3570 cm⁻¹) beobachtet werden, die indikativ für teilkristallines Hydroxylapatit ist. Die Banden bei 1415, 1455 und 1605 cm⁻¹ deuten darauf hin, dass Carbonatgruppen teilweise Phosphat substituiert haben und es sich nicht um stöchiometrisch reines Hydroxylapatit handelt. Stöchiometrisches und kristallines Hydroxylapatit wird üblicherweise durch Sputterprozesse nicht generiert, sondern es entstehen röntgenamorphe CaP-Phasen.⁽¹³⁰⁾

Der Grad der Kristallinität wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bestimmt, die IR-Spektren konnten aber teilweise Aufschluss darüber geben.⁽³⁰⁸⁾ Vergleicht man die in Abb. 4-72 dargestellten Spektren mit FTIR-Spektren verschiedener CaP-Phasen aus der Literatur,⁽¹²²⁾ scheint die erhaltene Phase aus einer nanokristallinen Form von carboniertem Apatit und Hydroxylapatit zu bestehen. Die gemessene Phosphatbande war schärfer als in rein amorphen CaP-Phasen, dort war die Bande aufgrund der nicht regulären Platzierungen der Ionen im Gitter stark verbreitert. Zudem ist die symmetrische P-O-Streckschwingung in amorphem CaP IR-inaktiv. Da diese Bande in den gemessenen Spektren aber detektierbar war, konnte die erhaltene Phase nicht vollständig amorph sein. Mit höherem Kristallinitätsgrad ist eine Aufspaltung der P-O-Schwingungsbande zwischen 1030 – 1100 cm⁻¹ zu erkennen. Dies ist bei den in dieser Arbeit verwendeten CaP-Modellschichten nicht beobachtet worden. Die scharfe O-H-Bande kommt erst in Calciumphosphaten höherer Kristallinität vor, sie konnte in den vorliegenden Schichten nachgewiesen werden. Dementsprechend legen die FTIR-Spektren der CaP-Modellschicht nahe, dass die Schichten teilkristallin und nicht vollständig amorph waren. Genaueren Aufschluss würden hierüber charakteristische Reflexe der Röntgendiffraktomie geben. Dies ist für ultradünne CaP-Schichten bisher nicht etabliert.

Substitution bestimmter Gruppen im HAp kommen *in vivo* grundsätzlich vor, auch hier besteht das mineralische Hartgewebe von Zähnen und Knochen nicht aus stöchiometrischem Hydroxylapatit.⁽¹²⁰⁾ Fluorapatit und carbonierter Apatit sind die bekanntesten Modifikationen. Da die vorliegenden gesputterten Schichten Charakteristika von carboniertem Apatit zeigen, liegt hier eine Form vor, die dem biologischen Hartgewebe recht naheliegt. Daher eignen sich die gesputterten CaP-Schichten gut als Modell für Untersuchungen von Grenzflächenprozessen an mineralischem Gewebe im Körper.

4.5.2 Stabilität ultradünner Calciumphosphat-Schichten in verschiedenen Lösungsmitteln

Obwohl die meisten CaP-Phasen eine geringe Löslichkeit in Wasser besitzen und sich besser in saurem Milieu auflösen, ist von dünnen CaP-Schichten auch bei neutralem pH-Wert eine deutlich höhere Löslichkeit bekannt.^{(309)(130),(135),(310)} Die Löslichkeit von mineralischem Gewebe hängt *in vivo* mit der Fähigkeit zur Bioresorbierbarkeit zusammen.⁽¹⁴³⁾ Eine hohe Löslichkeit der Schichten steht allerdings der Untersuchung von Adsorptionsprozessen an der CaP-Schicht entgegen. Daher wurde in verschiedenen Ansätzen untersucht, ob die Modellschichten in wässriger und organischer Lösung stabil sind. Da die Löslichkeit von CaP davon abhängt, wie viel Calcium- oder Phosphationen bereits in der Lösung vorhanden sind, wurde zur Stabilisierung der gesputterten CaP-Schichten mit Phosphat und Calcium übersättigter Puffer herangezogen. Kokubo et al. veröffentlichten in den 90er Jahren eine Methode, um mittels simulierter Körperflüssigkeiten (*simulated body fluid, SBF*) CaP auf Oberflächen abzuscheiden.⁽³¹¹⁾ Diese SBFs sind mit Calcium und Phosphat übersättigt, daher muss nach einem gewissen Zeitraum CaP ausfallen. Als Kontrollexperiment wurde daher die Stabilität der CaP-Modellschichten in SBF-Lösung untersucht. Zudem wurde die Stabilität der Schicht bei höherem pH-Wert untersucht, da CaP in alkalischem Milieu nicht gut löslich ist.

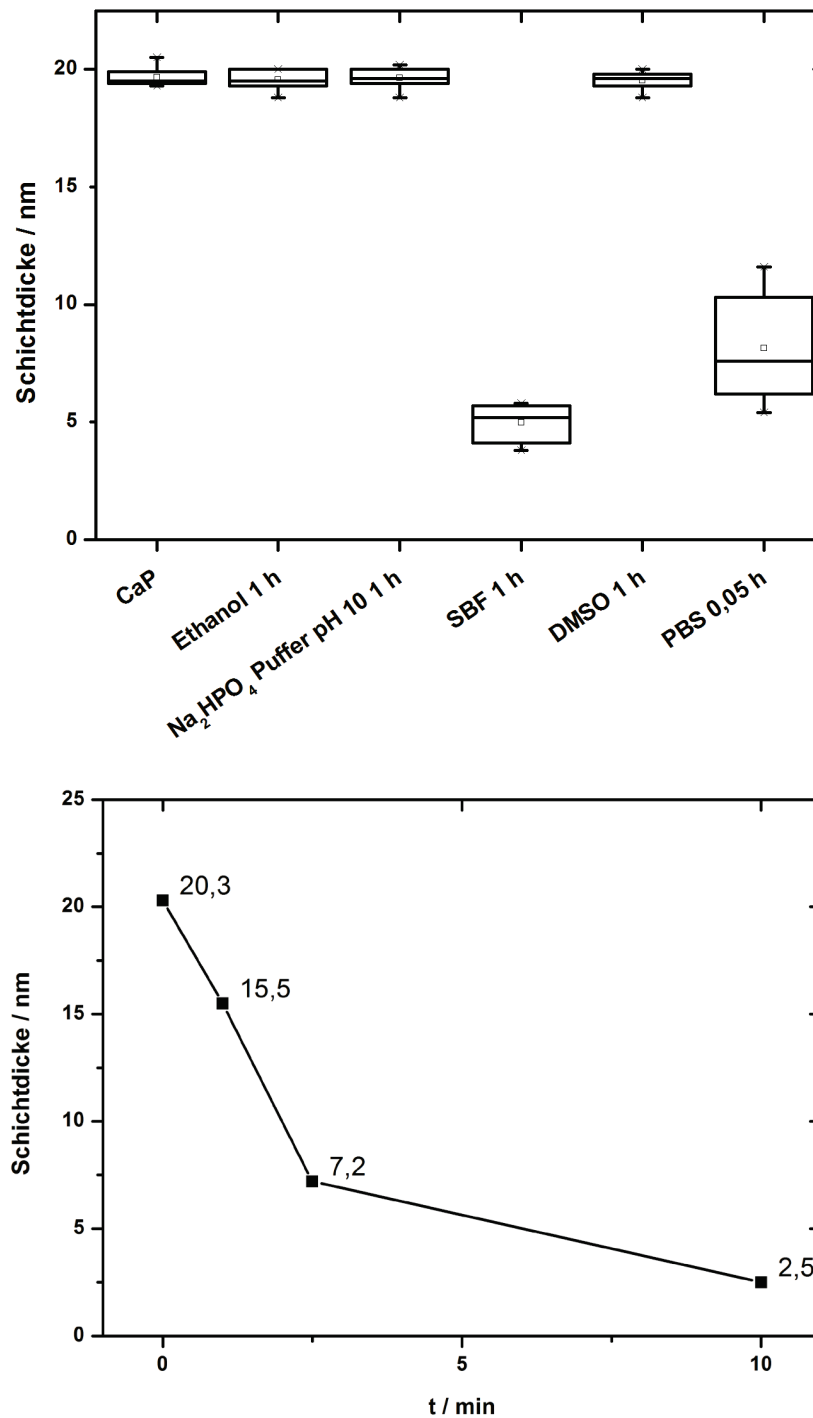


Abb. 4-73: Oben: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdickenabnahme nach Inkubation der CaP-Modelloberfläche in verschiedenen Lösungsmitteln (SBF = Simulated Body Fluid; DMSO = Dimethylsulfoxid). Unten: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdickenabnahme innerhalb von 10 min in PBS.

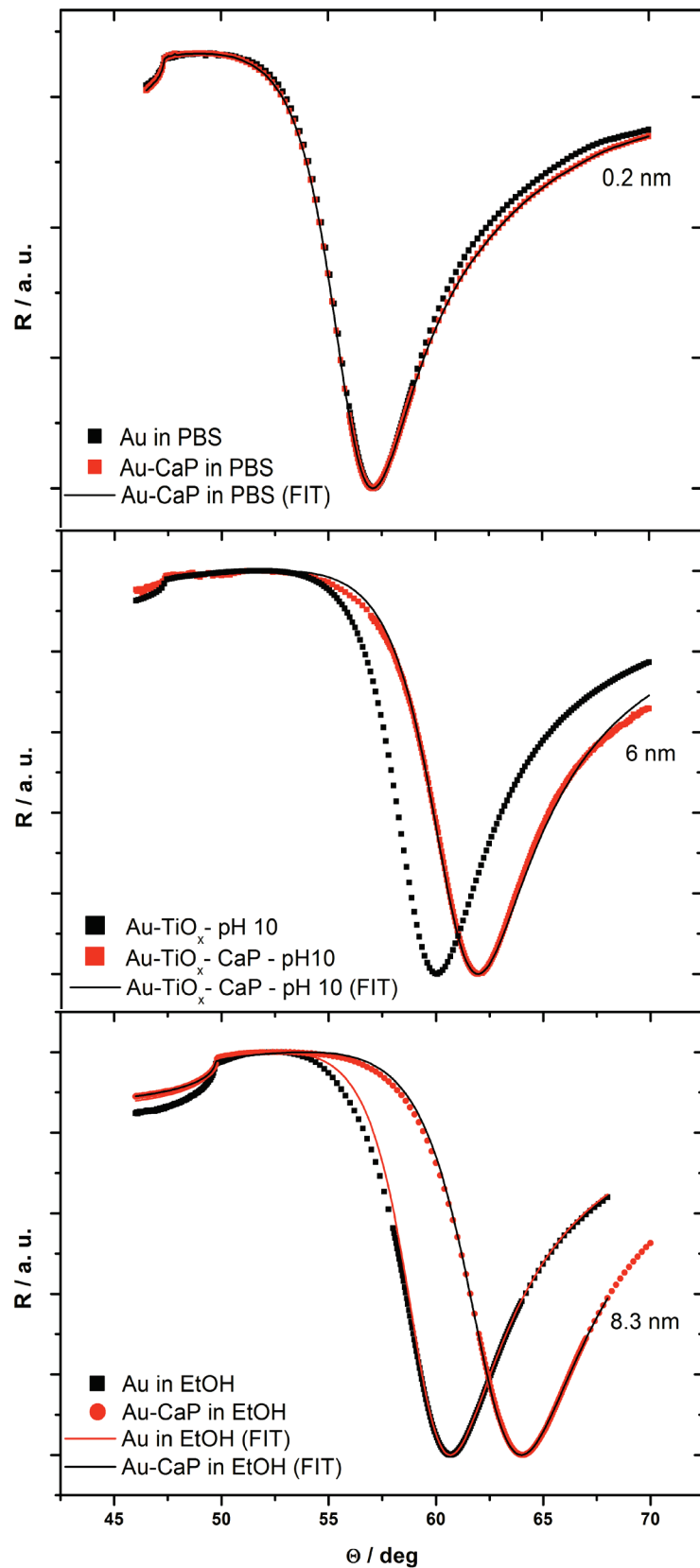


Abb. 4-74: SPR-Scans der CaP-Oberfläche in verschiedenen Lösungsmitteln. Oben: SPR-Scan einer Au und Au-CaP-Oberfläche nach 1 h Inkubation in PBS. Mitte: SPR-Scan nach 1 h Inkubation der Oberflächen in Phosphatpuffer mit pH 10. Unten: Stabilität von CaP nach 1 h Inkubation in EtOH. Nur in PBS war eine Schichtdickenreduktion von CaP zu beobachten.

Aus Abb. 4-73 lässt sich erkennen, dass die ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke in PBS innerhalb weniger Minuten signifikant abnahm. Parallel aufgezeichnete IRRAS-Spektren zeigten eine signifikante Abnahme der Intensität der Phosphatbande. Zudem verschwand die scharfe O-H-Bande im Spektrum völlig (Abb. 4-75). Dies deutet darauf hin, dass die CaP-Schicht aufgelöst wurde und an Kristallinität verlor. Auch die repräsentative SPR-Aufnahme in Abb. 4-74 zeigt den SPR-Scan der CaP-Modellschicht vor und nach Inkubation mit PBS, Ethanol und Na_2HPO_4 -Puffer mit pH 10. Nach Inkubation war die CaP-Schicht fast vollständig abgelöst. Unter diesen Bedingungen war eine Untersuchung der Adsorption des Schichtsystems auf den CaP-Modellschichten nicht möglich.

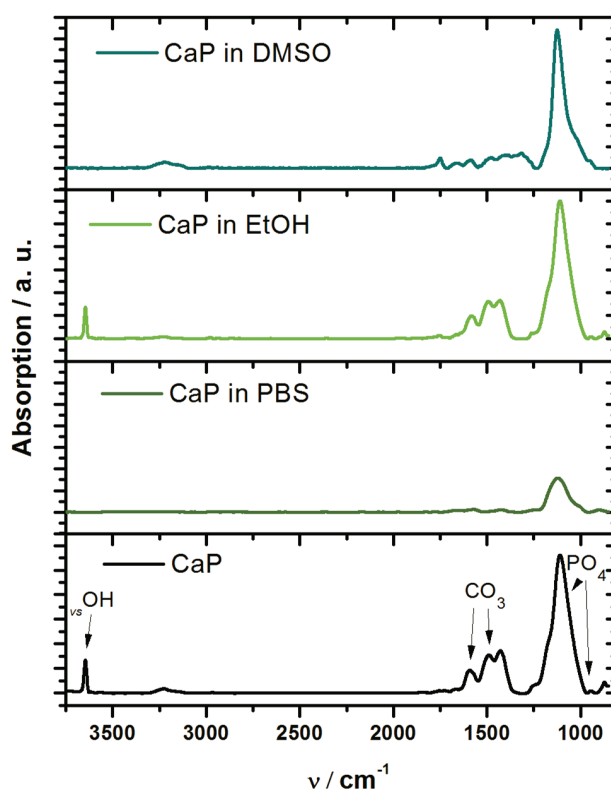


Abb. 4-75: IRRAS-Spektren der CaP-Modelloberfläche in verschiedenen Lösungsmitteln. Nach Inkubation der Oberfläche in PBS ist die Intensität der Phosphatbande deutlich reduziert, die O-H-Bande ist verschwunden. Bei den anderen Lösungsmitteln ergaben sich 1 h nach Behandlung keine signifikanten Veränderungen der Intensitäten/Position der charakteristischen Banden.

Abb. 4-75 zeigt, dass die CaP-Schicht in PBS-Lösung nicht stabil war. Dies kann auch über nachfolgende Rechnung verdeutlicht werden. Die verwendete SPR-Messzelle besitzt eine Fläche von ca. 0.8 cm^2 . Das Füllvolumen der Messzelle beträgt $20 \text{ }\mu\text{L}$. Nimmt man die gemessene CaP-Schichtdicke von 20 nm , ergibt sich für das Volumen V von CaP in der Messzelle:

$$V(\text{CaP}) = 0.8 \text{ cm}^2 \cdot 2.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm} = 1.6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^3 \quad (\text{Gl. 4-4})$$

Mit der CaP-Dichte (für Hydroxylapatit) von 3.16 g cm^{-3} ergibt sich daraus eine Masse $m(\text{CaP})$ von $5.06 \times 10^{-6} \text{ g}$, entsprechend $5.04 \times 10^{-9} \text{ mol}$.

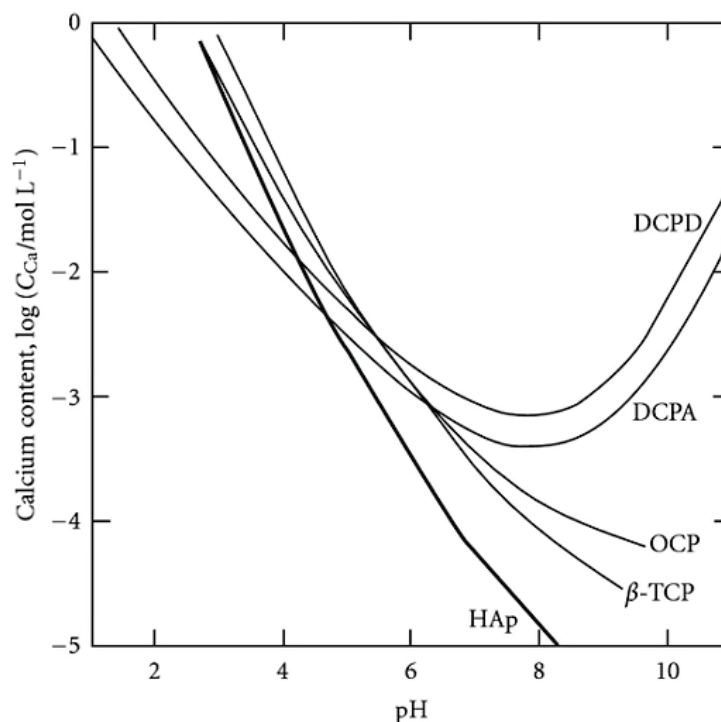


Abb. 4-76: Löslichkeitsverläufe von verschiedenen CaP-Phasen in Abhängigkeit des pH-Wertes bei 37°C , angegeben über die Gesamtkonzentration an Calciumionen in der Lösung. HAp (Hydroxylapatit), β -TCP (β -Tricalciumphosphat), OCP (Octacalciumphosphat), DCPA (wasserfreies Dicalciumphosphat), DCPD (Dicalciumphosphat Dihydrat).⁽³¹²⁾

In Abb. 4-76 ist die Löslichkeit von verschiedenen CaP-Modifikationen dargestellt. Da die in dieser Arbeit verwendete CaP-Phase dem Hydroxylapatit (HAp) am nächsten kommt (vgl. Abschnitt 4.5.1), wurden diese Daten als Grundlage für die nachfolgende Rechnung genommen. Aus den Daten aus Abb. 4-76 ergibt sich für HAp bei pH 7 ein gelöste Menge an Ca^{2+} von:

$$[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \quad (\text{Gl. 4-5})$$

In $20 \mu\text{L H}_2\text{O}$ würden sich demnach diese Konzentration an Calcium aus der gesputterten CaP-Modelloberfläche lösen. Diese Menge entspricht etwa 40 % der Stoffmenge der CaP-Modelloberfläche in der Messzelle. Wird nun bei einer Messung die Messzelle mit 1 mL wässriger Lösung gespült, wird sich die Schicht nahezu komplett auflösen. Da die obigen Berechnungen für die Annahme gelten, dass die CaP-Schicht aus HAp besteht, ist das nur die Mindestmenge, die sich lösen kann. Da

beim Sputtern üblicherweise aber keine hochkristallinen, sondern eher amorphe Strukturen entstehen, wird die Löslichkeit noch höher liegen.

Das Lösungsverhalten von Calciumphosphaten ist stark pH-abhängig. Berechnungen auf Grundlage der Daten von Kuroda et al.⁽³¹²⁾ für die Löslichkeit von HAp mit obiger Rechnung ergaben die in Abb. 4-77 dargestellten Ca^{2+} -Stoffmengen, die sich aus der Messzelle bei Kontakt mit Wasser herauslösen. Die aus der Schicht herausgelöste Ca^{2+} -Stoffmenge entspricht der Stoffmenge des CaP, das sich in der Messzelle bei Kontakt mit Wasser ablöst. Demnach dürfte sich nur ein Bruchteil der CaP-Schicht bei einem pH-Wert von 10 in der SPR-Messzelle ablösen, was auch durch die SPR- und IRRAS-Messungen bestätigt werden konnte.

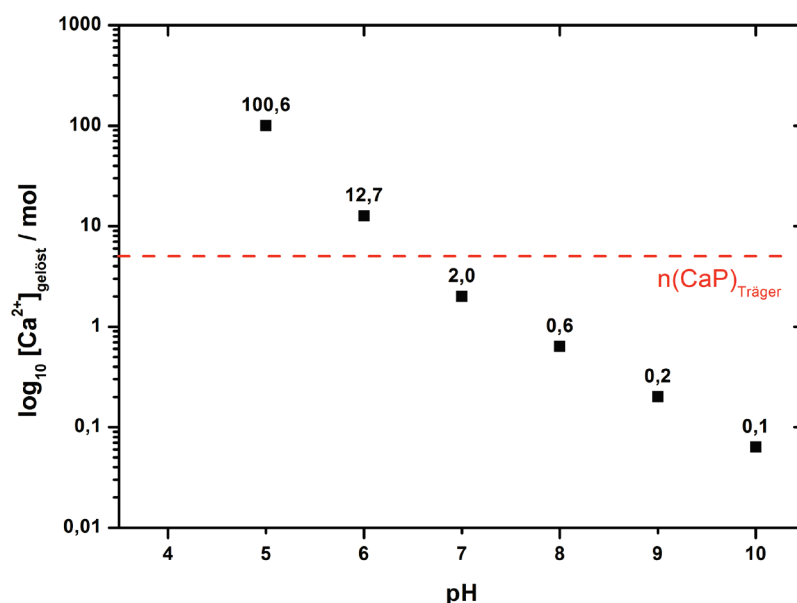


Abb. 4-77: Berechnete Stoffmenge an Calcium $[\text{Ca}^{2+}]$, die sich in einem Messzellenvolumen von $20 \mu\text{L}$ H_2O in Abhängigkeit des pH-Wertes aus dem gesputterten CaP-Substrat herauslöst. Rot eingezeichnet ist die Stoffmenge an CaP, die in der SPR-Messzelle vorhanden ist. Als Grundlage zur Berechnung dienten die Löslichkeitsdaten von HAp nach Kuroda et al.⁽³¹²⁾

Es widerspricht der gängigen Theorie, dass sich die ultradünnen CaP-Schichten in SBF auflösen (Abb. 4-73). Die Lösungen sind mit Ca^{2+} und PO_4^{3-} übersättigt, daher müsste die Ablagerung von CaP und damit ein Schichtdickenzuwachs beobachtet werden. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass der Großteil der in der Literatur beschriebenen Experimente, bei denen CaP durch SBF auf einer Oberfläche abgeschieden wurde, über einen Zeitraum von einigen Stunden bis hin zu Tagen verlaufen, die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hingegen nur über einen Zeitraum von 1 h. Es wurde auch schon von anderen Gruppen beobachtet, dass sich z. B. über Laserablationsverfahren oder Plasmasprühen

aufgebrachte dünne CaP-Schichten erst in SBF-Lösung auflösten und nach einiger Zeit in einer anderen CaP-Modifikation wieder ausfielen.^{(144),(313),(314)(143)} Möglicherweise wäre das CaP auch in den vorliegenden Versuchen bei längerer Messung wieder ausgefallen, doch weil der experimentelle Fokus auf der Suche nach einer die CaP-Schicht stabilisierenden Flüssigphase lag, wurde auf Verlängerung der Experimentdauer verzichtet. Eine Auflösung der CaP-Schicht durch das Lösungsmittel ist für die Untersuchung der Biofunktionalisierung einer CaP-Oberfläche mit SPR-Spektroskopie ein Ausschlusskriterium. Daher wurde der Ansatz mit SBF nicht weiterverfolgt.

Bei dem in Abschnitt 3.1.2 eingeführten Schichtsystem wird bei der Adsorption des Aminosilans und des Biotins organisches Lösungsmittel verwendet. Es ist nicht bekannt, dass CaP-Schichten in organischem Lösungsmittel dissolvieren. Trotzdem wurde untersucht, ob die Behandlung mit organischem Lösungsmittel einen Effekt auf z. B. die Oberflächenstruktur besitzt. Aus Abb. 4-73 lässt sich erkennen, dass die ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke nach einstündiger Inkubation des Lösungsmittels keiner Veränderung unterlag. Zudem zeigten die IRRAS-Spektren derart behandelte CaP-Schichten auch keine Veränderungen im Spektrum (Abb. 4-75). Die fehlende O-H-Bande war lediglich auf das Alter der untersuchten Proben zurückzuführen, da sie nach längerer Lagerung verschwand. Daher kann geschlossen werden, dass die CaP-Schichten stabil in organischen Lösungsmitteln sind und Adsorptionsprozesse wie die Kopplung eines Aminosilans und des Sulfo-NHS-LC-Biotins, die in Methanol und Ethanol durchgeführt werden, somit ohne Einschränkungen durch potentielle Auflösung der CaP-Oberfläche untersucht werden können.

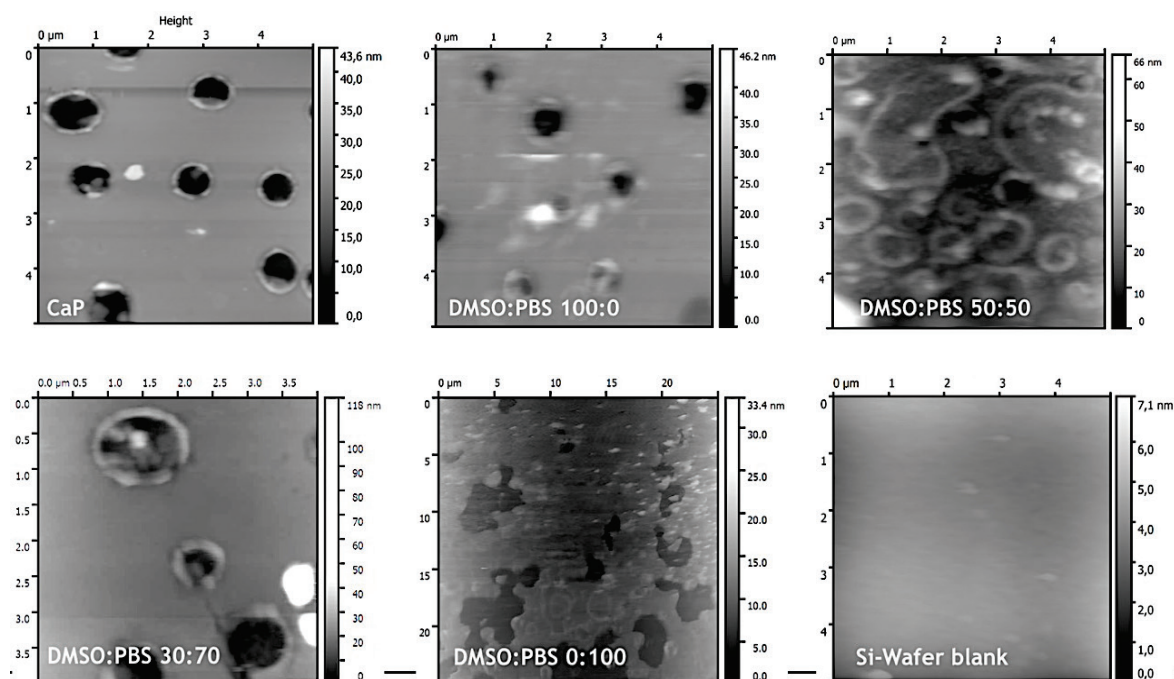


Abb. 4-78: Topografie von CaP-Oberflächen nach Behandlung in verschiedenen DMSO:PBS-Verhältnissen im Vergleich zur unbehandelten CaP-Schicht (oben links) und einem unbeschichteten Si-Wafer (unten rechts). Die porenartigen Defekte auf der Oberfläche wurden als Beurteilungsmerkmal herangezogen. Erst bei Applikation von reinem PBS sind erhebliche strukturelle Veränderungen durch Auflösung der CaP-Schicht erkennbar. Hierbei wurde die Skalierung geändert, um die Defekte sichtbar zu machen.

Darüber hinaus wurde die Stabilität der CaP-Modellschicht im Hinblick auf die Proteinadsorption in verschiedenen Verhältnissen von DMSO:PBS untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Proteine in DMSO gut löslich sind und nicht denaturieren.^{(315),(316),(316)} So wird z. B. hinsichtlich der Biotinylierungsreaktion von Proteinen vom Hersteller empfohlen, die Konjugationsreaktion in DMSO durchzuführen.⁽³¹⁷⁾ DMSO wird sowohl als Kryoprotektor als auch als Transporter für pharmazeutische Produkte durch die Zellmembran eingesetzt.^{(318),(319)} Damit ist DMSO ein potentiellies Lösungsmittel, um die Adsorption von Streptavidin an eine biotinylierte Oberfläche auch in organischem Lösungsmittel durchzuführen. Abb. 4-79 zeigt, dass die CaP-Modellschichten bis zu einem DMSO:PBS-Verhältnis von 30:70 keine ellipsometrisch nachweisbare Schichtdickenreduktion erfuhren. Untersuchungen mit AFM ergaben keine Änderung der Oberflächenstruktur nach Behandlung mit verschiedenen DMSO:PBS-Verhältnissen (Abb. 4-78). Die auf der Oberfläche sichtbaren Poren wurden dabei als Parameter zur optischen Beurteilung der Veränderung der Oberflächenstruktur herangezogen. Erst nach Inkubation der CaP-Modellschicht in reinem PBS zeigten sich im AFM auf der Oberfläche sichtbare Veränderung und großflächige Defekte in der Schicht. Aus der Literatur ist bekannt,

dass geringe Anteile DMSO in wässrigen Lösungsmitteln dünne CaP-Schichten stabilisieren können.⁽³²⁰⁾

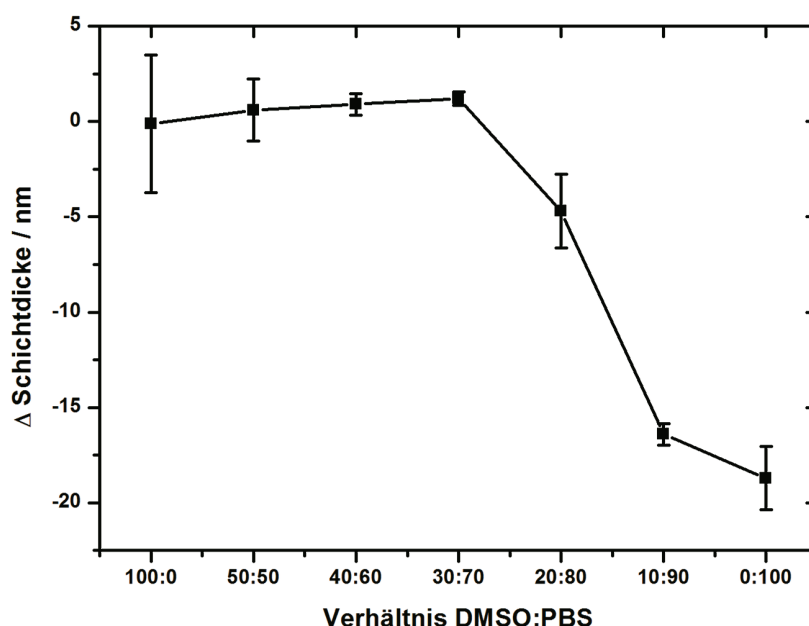


Abb. 4-79: Veränderung der Schichtdicke einer gesputterten CaP-Schicht nach 1 h Inkubation in verschiedenen Verhältnissen von DMSO:PBS. Bis zu einem Verhältnis von 30:70 unterliegt die Änderung der Schichtdicke keiner signifikanten Abnahme.

Die Ergebnisse zur Stabilitätsuntersuchung der CaP-Modellschicht in verschiedenen Möglichkeiten zeigen, dass Adsorptionsprozesse in organischer Lösung die CaP-Schicht prinzipiell nicht beeinträchtigen. Bei allen Adsorptionsprozessen, die auf wässrigen Lösungen basieren, gibt es jedoch signifikante Einschränkungen durch Dissolvation der CaP-Schicht. Einige Lösungsmittel wurden in diesen Untersuchungen herausgestellt, in der die CaP-Schicht stabil war. Ziel der weiterführenden Untersuchungen war es nun zunächst, diese Lösungsmittel hinsichtlich ihrer Tauglichkeit für die Adsorption von Streptavidin an eine biotinylierte Oberfläche zu untersuchen.

4.5.3 Adsorption von Streptavidin auf TiO_x in verschiedenen Lösungsmitteln

Die Adsorption von Streptavidin auf die biotinylierte Oberfläche wurde standardmäßig in PBS durchgeführt. Da die gesputterte CaP-Schicht in wässriger Lösung nicht stabil war, muss die Adsorption der Proteinlösungen entweder

- a) in einem alkalisch gepufferten Lösungsmittel durchgeführt werden oder
- b) auch in organischer Lösung möglich sein.

Als Vergleichsreferenz wurde die Adsorption von Streptavidin auf eine gemäß Abschnitt 3.1.2 biotinylierte TiO_x -Modelloberfläche herangezogen. Aus vielen Untersuchungen ist hinreichend bekannt, welche Streptavidin-Schichtdicke mit einem PBS-Puffer pH 7.4 nach einer Adsorptionszeit von ca. 45 – 60 min erhalten wird. In den Untersuchungen zur Adsorption von Streptavidin auf eine biotinylierte TiO_x -Oberfläche wurde selektiv nur das Lösungsmittel geändert und die Streptavidin-Schichtdicke bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-80 dargestellt und zeigen eine schlechte Adsorption von Streptavidin an Biotin in reinen organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder DMSO sowie in phosphatgepufferter Lösung mit einem eingestellten pH-Wert von 10.

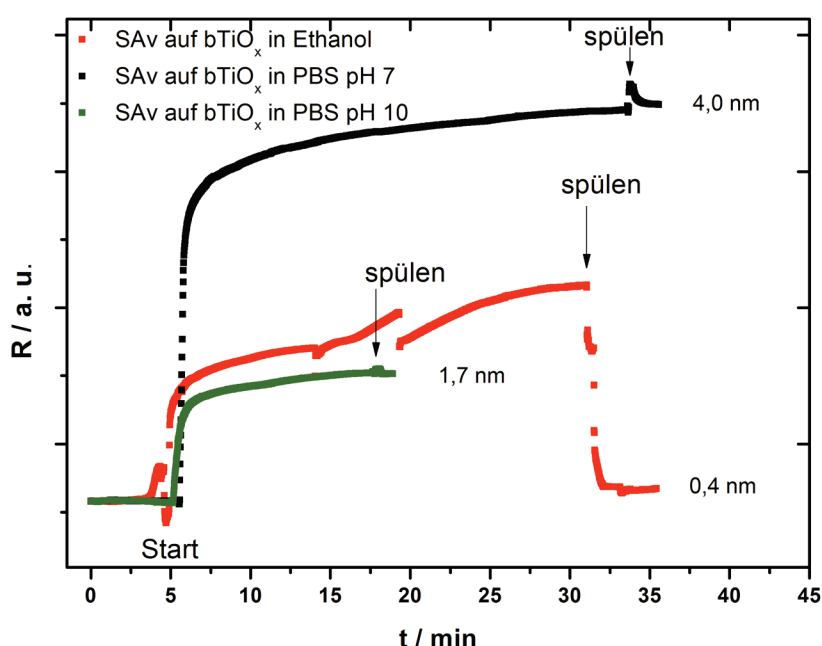


Abb. 4-80: Echtzeitkinetiken der Streptavidinadsorption an eine biotinylierte TiO_x -Oberfläche in verschiedenen Lösungsmitteln (PBS, Phosphatpuffer pH 10 und Ethanol).

Die Echtzeitkinetiken im SPR konnten für DMSO:PBS-Verhältnisse mit einem DMSO-Anteil $> 30 \%$ nicht dargestellt werden. Reines DMSO hat einen hohen Brechungsindex von 1.47.⁽¹⁵⁹⁾ Dadurch ist das Resonanzminimum des Oberflächenplasmons in einem Winkelbereich von $45 - 70^\circ$ nicht mehr detektierbar. Für die verschiedenen DMSO-PBS-Verhältnisse wurde die Dielektrizitätskonstante ϵ_{real} mit SPR bestimmt (Abb. 4-81).

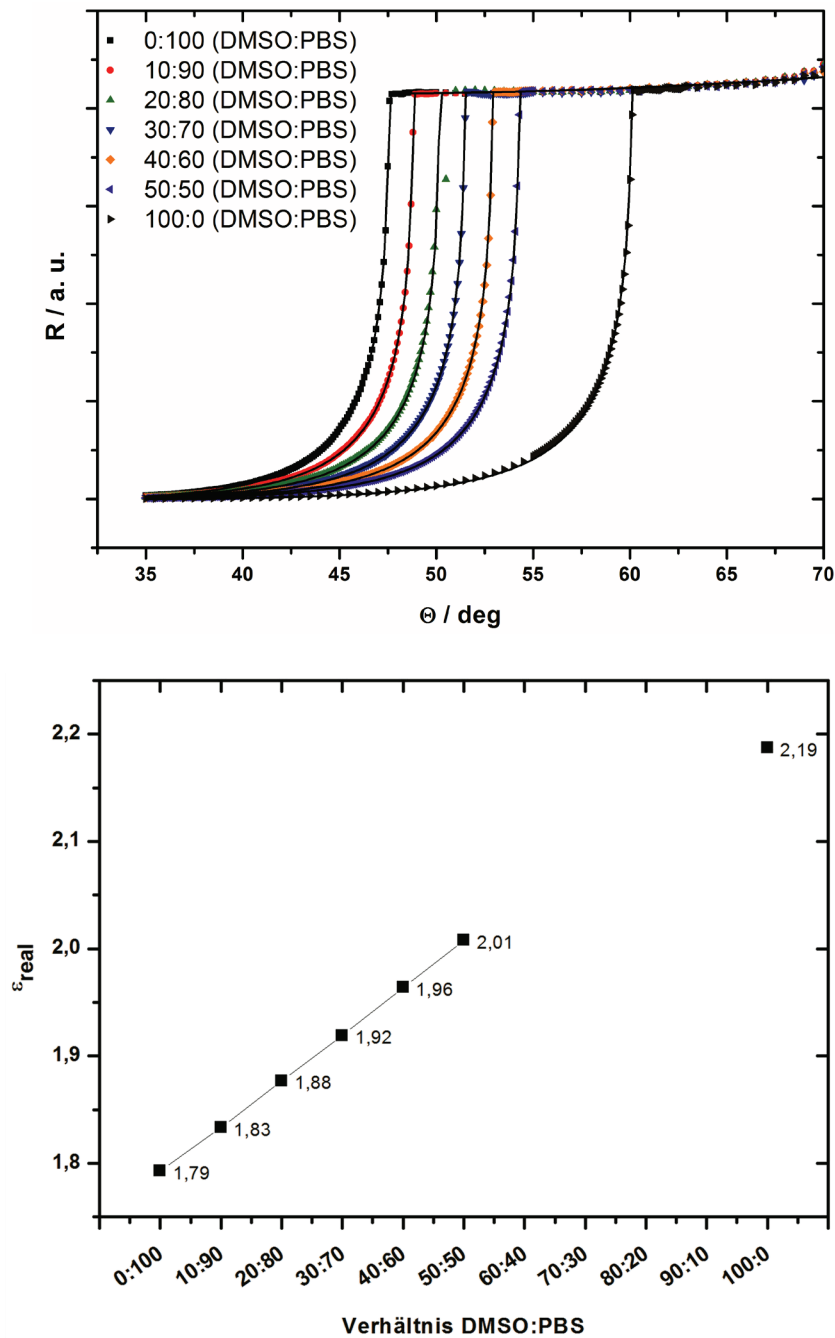


Abb. 4-81: Oben: Veränderung der Dielektrizitätskonstante ϵ_{real} eines DMSO-PBS-Gemisches in Abhängigkeit des DMSO-Anteils mit dem entsprechenden Fresnel-Fits. Unten: Die ermittelten Dielektrizitätskonstanten für verschiedene DMSO:PBS-Verhältnisse (v/v).

Die SPR-Messungen zeigten eine Proportionalität der Dielektrizitätskonstanten zum eingesetzten Mischungsverhältnis. Bei einem DMSO:PBS-Verhältnis von 30:70 (v/v) lag das Oberflächenplasmon wieder im detektierbaren Winkelbereich, daher konnten hier Echtzeitkinetiken aufgezeichnet werden. Die SPR-Scans von Streptavidin in reinem DMSO wurden gefittet, indem nach Ende der Adsorptionskinetik mit reinem DMSO gespült wurde und anschließend ein

Lösungsmittelwechsel auf PBS erfolgte. Danach wurde der Fresnel-Fit der Schichtdicke für PBS durchgeführt (Abb. 4-83 bis Abb. 4-86).

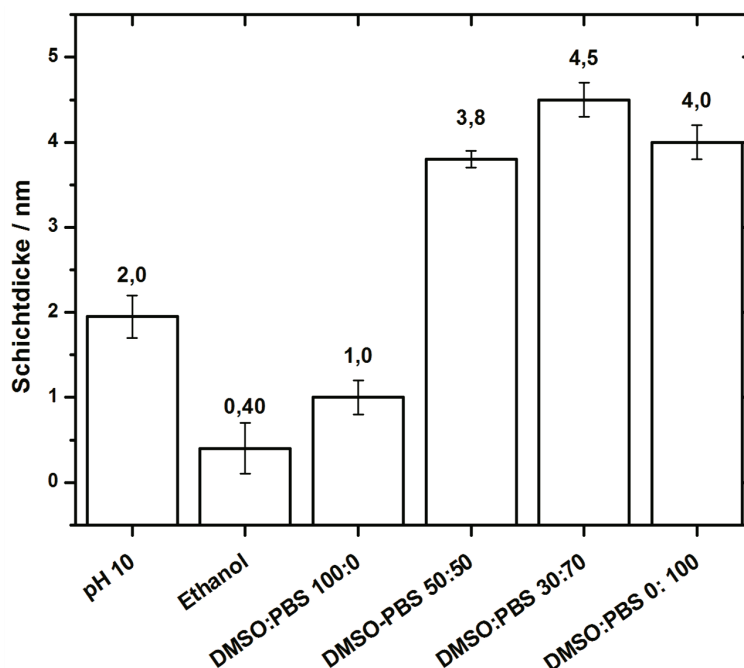


Abb. 4-82: Streptavidinschichtdicke nach Adsorption auf eine biotinylierte TiO_x -Modelloberfläche in verschiedenen Lösungsmitteln. In einem DMSO-PBS-Gemisch von 30:70 (v/v) konnte die höchste Streptavidinadsorption erzielt werden.

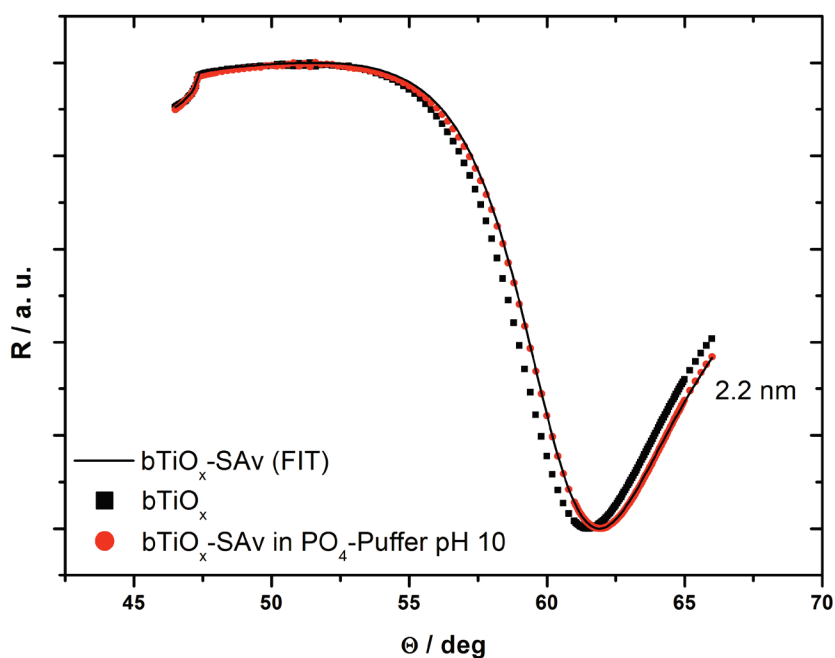


Abb. 4-83: SPR-Scan und Fresnel-Fit einer biotinylierten TiO_x -Oberfläche nach Adsorption von Streptavidin (SAv) in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 10.

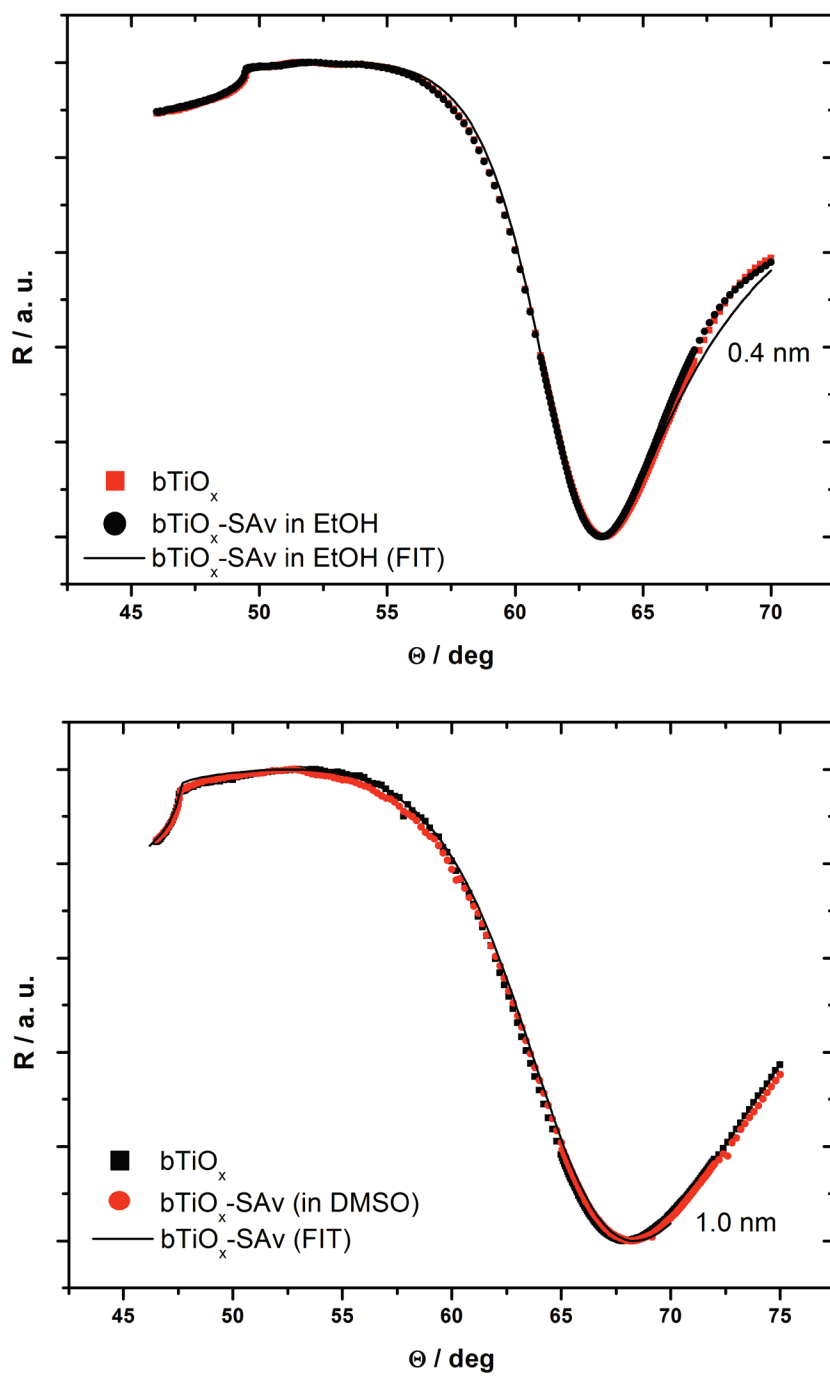


Abb. 4-84: SPR-Scans und Fresnel-Fits biotinierter TiO_x -Oberflächen nach Adsorption von Streptavidin (SAv) in Ethanol (oben) und DMSO (unten).

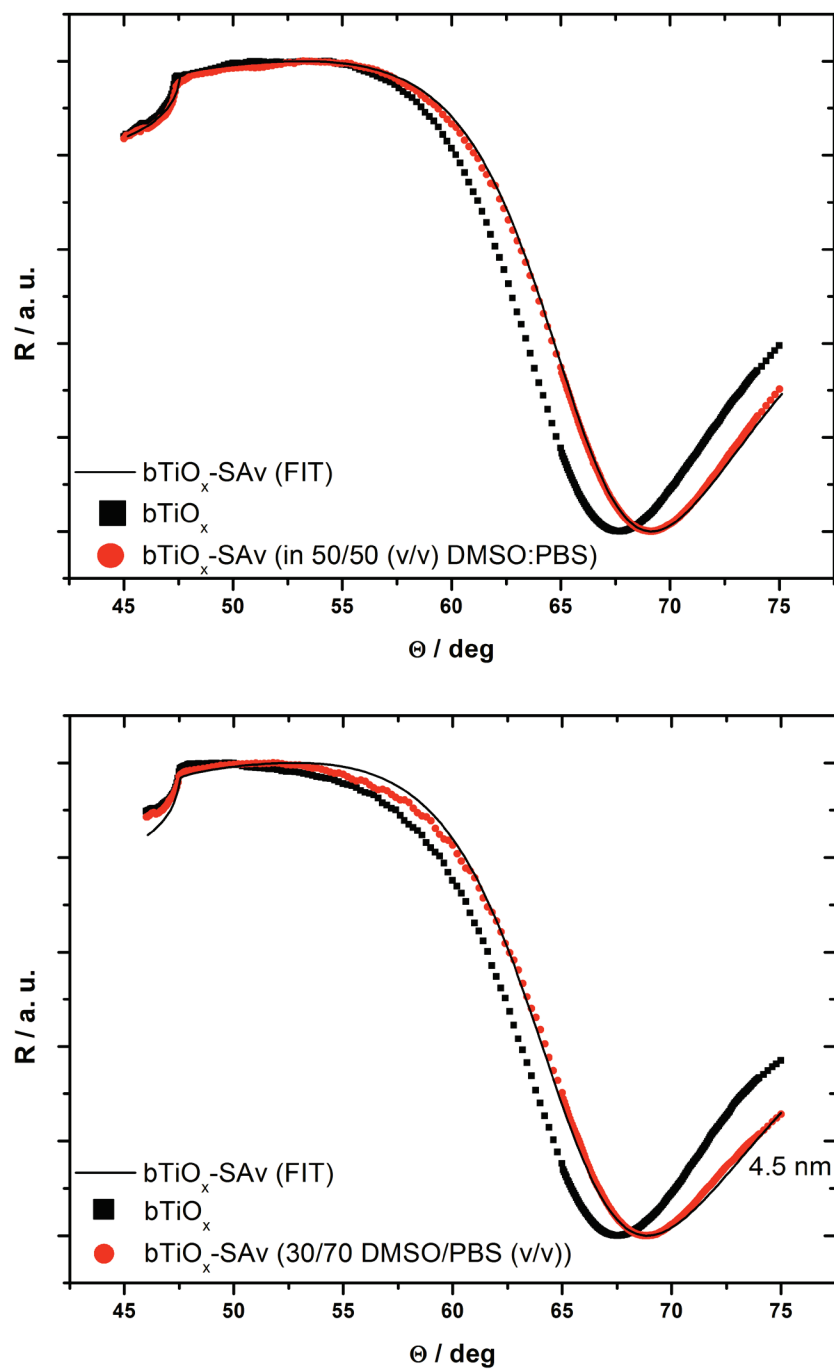


Abb. 4-85: SPR-Scans und Fresnel-Fits biotinylierter TiO_x -Oberflächen nach Adsorption von Streptavidin in DMSO:PBS-Gemischen von 50:50 v/v (oben) und 30:70 v/v (unten).

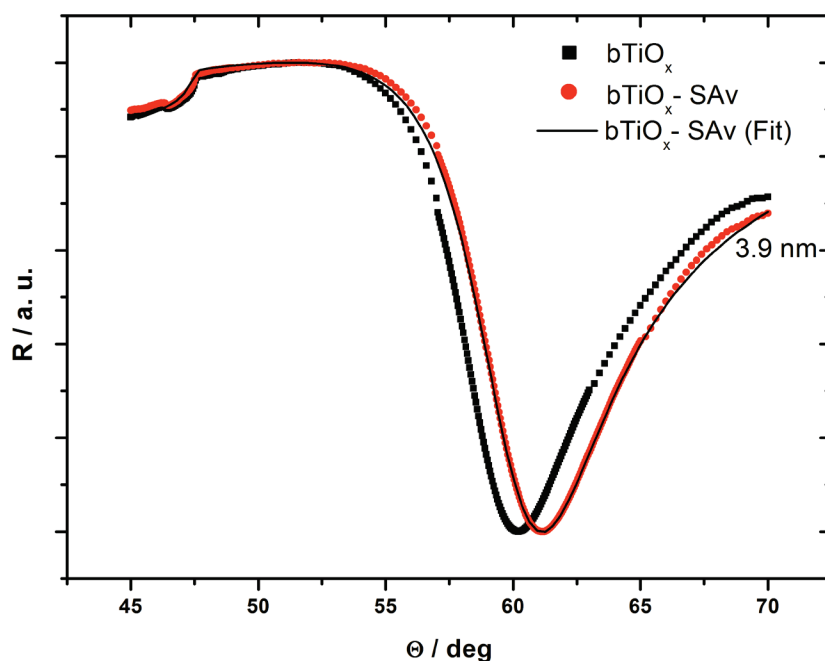


Abb. 4-86: SPR-Scan und Fresnel-Fit einer biotinylierten TiO_x -Oberfläche nach Adsorption von Streptavidin (SAv) in PBS mit einem pH-Wert von 7.

Bei einem DMSO:PBS-Verhältnis von 30:70 wurde reproduzierbar die höchste Schichtdicke von Streptavidin festgestellt (Abb. 4-82). Dieser Wert lag ca. 0.5 nm über dem Referenzwert der Streptavidinschichtdicke bei pH 7. Selbst bis zu einem DMSO:PBS-Verhältnis von 50:50 ergab sich eine mit dem Referenzwert bei pH 7 vergleichbare Streptavidinadsorption. Dieser Unterschied ist im Rahmen der Standardabweichung und Messungenauigkeit bei SPR-Messungen durchaus als bedeutend einzustufen. Unterstützend zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen wurde der verstärkende Effekt von DMSO bei der Bindung von Streptavidin an Biotin auch in einer industriell relevanten Applikation beobachtet.⁽³²¹⁾ Als mögliche Erklärung können dabei die molekularen Interaktionsprozesse in der Bindungstasche in Anwesenheit von DMSO herangezogen werden:

Nach gängigem Verständnis sind Protein-Substrat-Wechselwirkungen oder durch Enzyme katalysierte Reaktionen wasserbasierte Prozesse. In organischen Lösungsmitteln können diese Reaktionen nicht stattfinden oder die Proteine denaturieren. Diese Annahme ist so nicht richtig. In den letzten Jahren ist ein neuer Forschungszweig entstanden, der sich mit der Katalyse enzymatischer Reaktionen in organischem Lösungsmittel beschäftigt. Es sind mittlerweile viele organische Lösungsmittel bekannt, in denen enzymatische Prozesse katalysiert werden können,

und dies z. T. mit weithaus höherer Geschwindigkeit.⁽³²²⁾ Entscheidend sind dabei natürlich die Art der Wechselwirkung in der Bindungstasche und die Eigenschaften des Lösungsmittels. DMSO ist ein polares, amphiphiles Lösungsmittel. Es bildet in wässriger Lösung starke Wasserstoffbrückenbindungen mit zwei Wassermolekülen pro DMSO-Molekül aus (Abb. 4-87).⁽³¹⁹⁾ Dadurch wird die Mikrostruktur von Wasser gestört.

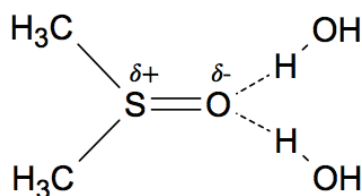


Abb. 4-87: Verhalten von DMSO in wässriger Umgebung. Im optimalen Verhältnis bildet es Wasserstoffbrücken mit zwei Wassermolekülen aus. Dadurch wird die geordnete Mikrostruktur des Wassers gestört.

Einige Enzyme sind bereits hinsichtlich ihrer strukturellen Stabilität und katalytischen Aktivität in DMSO-haltigen Lösungsmitteln charakterisiert worden.^{(323)–(326)} Dabei konnte einheitlich beobachtet werden, dass geringe Anteile an DMSO in einem wässrigen Lösungsmittel die katalytische Aktivität von z. B. Lysozym und anderen Proteinen signifikant erhöht.^{(327),(328)} Als Ursache hierfür wird eine Erniedrigung der Energiebarriere für die Bindung und katalytische Prozession des Substrats diskutiert.^{(329),(330)} Durch die Anwesenheit eines gewissen Anteils an DMSO-Molekülen wird die für die Bindung des Substrats notwendige strukturelle Reorganisation des aktiven Zentrums energetisch herabgesetzt, sodass das Protein etwas von seiner Faltungsenergie und damit einhergehend von seiner Stabilität verliert und eine schnellere Bindung erfolgt.^{(331),(332)} Durch Kontaktverluste katalytisch aktiver Reste ist z. B. insbesondere im Lysozym eine schnellere elektrostatische Stabilisierung des Übergangszustandes während der Katalyse möglich. Im Lysozym sind hydrophobe Tryptophanreste im Aktivitätszentrum katalytisch entscheidend. Die Interaktionen dieser Reste mit dem Substrat können durch das amphiphile DMSO verstärkt werden, während stabilisierende H-Brücken immer noch möglich sind.

Bei der Bindung von Streptavidin an das Biotin sind strukturell auch vier Tryptophanreste entscheidend (Trp₇₉, 92, 108, 120, Abb. 4-88).⁽³³³⁾ Daher kann der oben beschriebene Prozess der Beschleunigung der Katalyse im Lysozym durch geringe Anteile von DMSO (bis zu 20 %) auch grundsätzlich zur Erklärung der verbesserten

Bindung von Streptavidin an die biotinylierte Oberfläche herangezogen werden. Möglicherweise werden die vier an der Biotinbindung beteiligten Tryptophanreste durch die Anwesenheit von DMSO strukturell exponiert, sodass eine schnellere, stärkere Bindung an Biotin möglich ist.

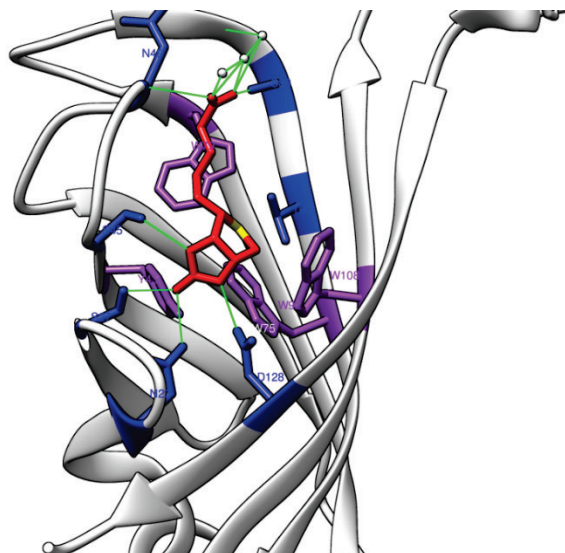


Abb. 4-88: Streptavidin-Biotin-Interaktionen in der Bindungstasche. Blau sind die Reste dargestellt, die die Struktur durch eine Wasserstoffbrückenbindung (grün) stabilisieren. Aromatische Reste sind violett gefärbt. Diese stabilisieren durch hydrophobe Wechselwirkungen die Ringstruktur des Biotins. Modelliert mit Chimera auf Basis der Daten von 1STP.⁽³³³⁾

Während die Aktivität von Lysozym mit steigendem DMSO-Anteil signifikant abfiel und das Protein strukturell entfaltet wurde, blieb die Bindung von Streptavidin an Biotin selbst in reinem DMSO möglich, wenn auch nur noch zu 20 %. Streptavidin ist ein äußerst stabiles Protein, wie bereits unter 4.2.3 beschrieben. Es bleibt selbst in Acetonitril und bei geringen Anteilen an Ameisensäure stabil^a. Aufgrund der vielen hydrophoben Reste auf der Oberfläche kann es durch Anlagerung der hydrophoben Methylgruppen des DMSO solvatisiert werden, ohne dass es zur strukturellen Entfaltung kommt.

Dieses Ergebnis führt zu einer Verbesserung des in dieser Arbeit angewandten molekularen Schichtsystems. Es ist damit unter Annahme einer Monolayerdicke von 4.8 nm ein Bedeckungsgrad mit Streptavidin von > 90 % möglich. Dies stellt eine Steigerung um 10 % gegenüber den bisher in der AG Biophysik erzielten Ergebnissen dar.⁽¹⁶⁾ Darüber hinaus ist dieses Ergebnis für die potentielle Anwendung als Biofunktionalisierung auf Implantaten ein deutlicher Fortschritt

^a Dies wurde im Rahmen einer Laborpraxis mit MSc. Marie Theiß untersucht.

hinsichtlich der sterilen Produktion von Implantatbeschichtungen. Es muss demnach kein steriles, wässriges Lösungsmittel für die Beschichtungsvorgänge eingesetzt werden, denn in organischen Lösungsmitteln können Bakterien nicht überleben. So könnte eine für Implantate erforderliche, aber die Biofunktionalisierung potentiell schädigende Sterilisation umgangen werden. Aus ersten Untersuchungen geht auch hervor, dass biotinylierte Moleküle wie z. B. biotinyliertes Protein L in dem gleichen Lösungsmittel an den Streptavidinmonolayer adsorbiert werden können (Abb. 4-89).

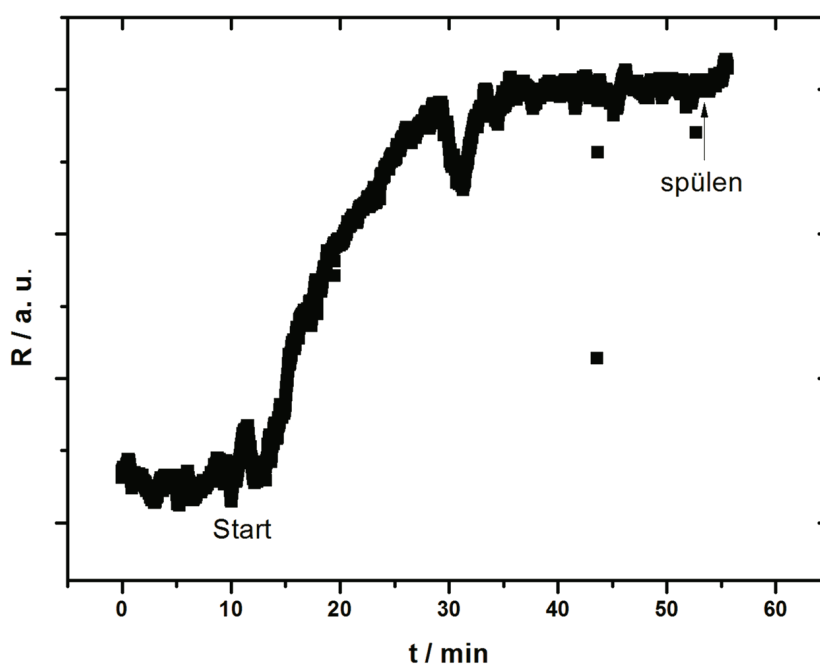


Abb. 4-89: Echtzeitkinetik von biotinyliertem Protein L in einem 30:70 DMSO:PBS-Gemisch an einen Streptavidinmonolayer auf CaP.

4.5.4 Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat

Silanisierung und Biotinylierung

Um die Zusammensetzung des molekularen Schichtsystems und damit einhergehend spezifische Charakteristika nicht grundlegend zu verändern, wurde das Schichtsystem unter vergleichbaren Bedingungen auf CaP aufgebracht wie auf TiO_x . Da aber CaP auf der Oberfläche keine Hydroxylgruppen exponiert wie TiO_x , die für eine kovalente Anbindung des Aminosilans in Frage kommen, wurde zusätzlich eine 10-fache Konzentration des Aminosilans verwendet. Damit sollte eine zu geringe Oberflächendichte des Aminosilans auf der Oberfläche verhindert werden.

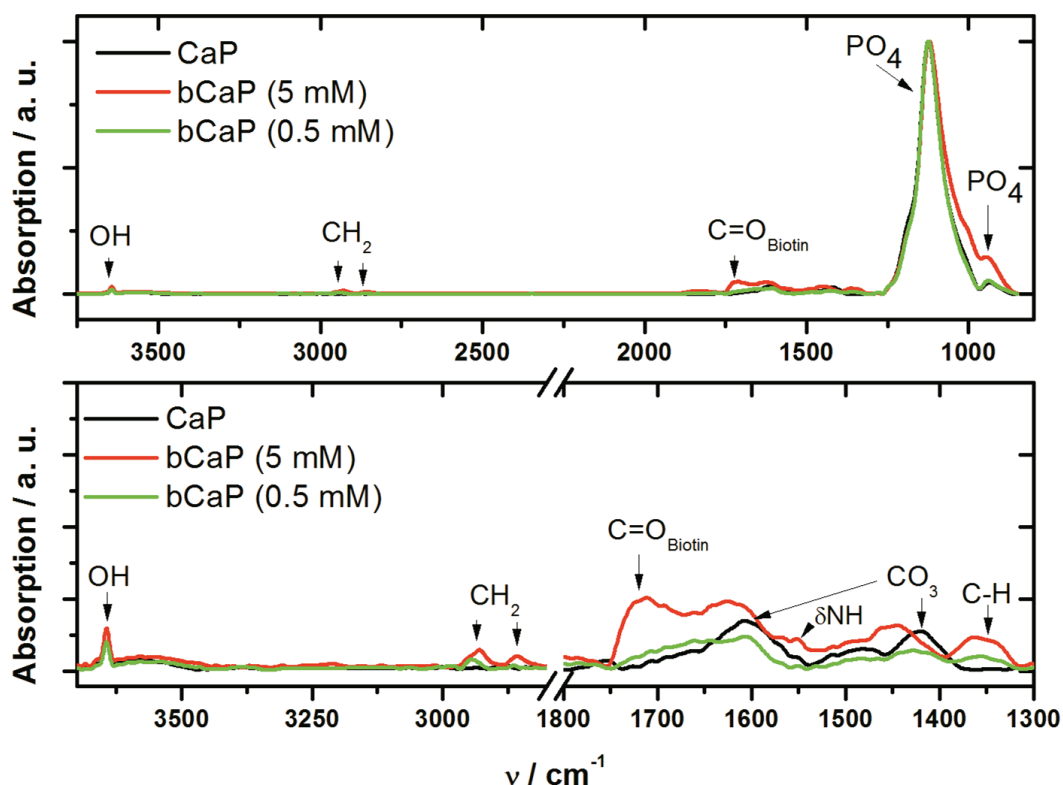


Abb. 4-90: IRRAS-Spektren der direkten Adsorption des Biotin-Streptavidin Schichtsystems auf CaP. Dargestellt sind die Banden bis zur Funktionalisierung mit Biotin. Oben: Übersicht des Spektrums. Unten: 10-fache Vergrößerung des Spektrums in den Bereich der für die Funktionalisierung relevanten Banden. Durch eine Erhöhung des Aminosilans um den Faktor 10 waren die Banden auf der Oberfläche intensiver. Die Spektren sind auf das Maximum der Phosphatbande normiert.

Wie aus Abb. 4-90 hervorgeht, konnte das molekulare Schichtsystem direkt auf die CaP-Oberfläche aufgebracht werden. Die Adsorption einer 0.5 mM methanolischen AHAPTMES-Lösung mit anschließender Biotinylierung zeigte in ellipsometrischen Messungen einen geringen Schichtdickenzuwachs von 1.1 ± 0.6 nm nach dem Spülvorgang. Im IRRAS-Spektrum waren nach der Silanisierung und Biotinylierung Banden bei 1750, 1586 und 2930 cm^{-1} sichtbar. Diese entstehen durch die Schwingung der C=O-Gruppe des Thiophenrings vom Biotin, der N-H-Biegeschwingung der Aminogruppe und der Streckschwingung der C-H₂-Gruppen des Silans und Biotins. Die Bandenintensitäten unterschieden sich zwischen den Proben mit 0.5 mM und 5 mM Aminosilan in der Intensität. Dies ist auf eine unterschiedliche Oberflächendichte zurückzuführen. Da auf CaP nicht die Hydroxylgruppen zur Verfügung stehen wie auf TiO_x, ist die Adsorption eines SAMs des Silans auf der Oberfläche abhängig von der Kondensationsreaktion der Silane untereinander. Diese Reaktion ist bei erhöhter Aminosilankonzentration kinetisch beschleunigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Silikat-Schicht zur Verknüpfung der anorganischen und organischen Komponenten nicht zwingend notwendig ist. Dies wurde bereits auch von Russo et al. vorgeschlagen, die die Funktionalisierung von carboniertem Hydroxylapatit mit Aminopropyltrimethoxysilan (APTES) untersuchten.⁽¹¹³⁾ Die Kondensation der Aminosilane untereinander scheint eine ausreichende Bedeckung und stabile Physisorption an das CaP für weitere Funktionalisierungsschritte zu bieten.

Auf welche Art die Silangruppen an das CaP binden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird argumentiert, dass es sich bei CaP um ein anorganisches Material in einem definierten Kristallgitter handelt, bei dem die für die Konjugation der Silane notwendigen Hydroxyl- oder Phosphatgruppen nicht für Reaktionen zur Verfügung stehen.⁽³³⁴⁾ Demnach sind alle Bindungen im und an Calciumphosphat ionischer Natur. Auf der anderen Seite werden verschiedene Bindungsmöglichkeiten von Silanen an CaP vorgeschlagen (Abb. 4-91), wobei die potentielle Bindung des Sauerstoffes am Silizium an die Phosphat- oder Hydroxylgruppe des Apatits durch XPS-Messungen gestützt wird.^{(121),(335)}

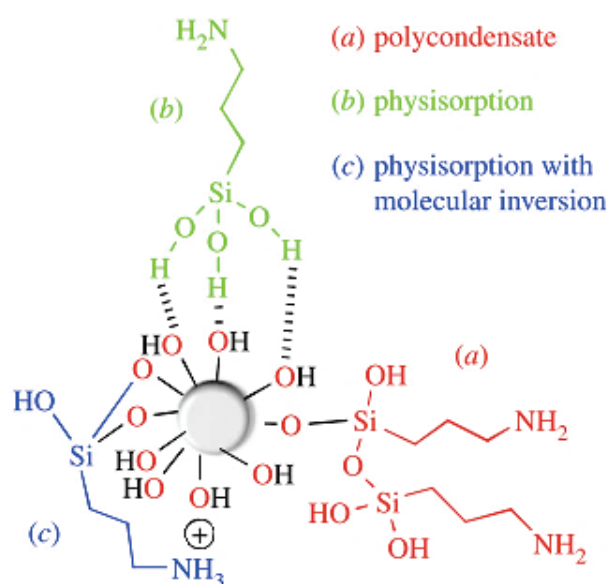


Abb. 4-91: Mögliche Bindungen von Silangruppen an eine CaP-Oberfläche. Der Großteil der Wechselwirkungen beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen mit Hydroxylgruppen des CaP. Entnommen aus Russo et al.⁽¹¹³⁾

Biologischer Apatit kristallisiert in der hexagonalen Raumgruppe $P6_3/m$.⁽³³⁴⁾ Hierbei sind die Ionen in der Einheitszelle so geordnet, dass eine kovalente Bindung an die Phosphatgruppe die Struktur erheblich schwächen würde. Zwar wird häufig beobachtet, dass Phosphatgruppen durch Carbonatgruppen substituiert sind, dies führt aber zur Stabilisierung der Kristallstruktur. Eine kovalente Bindung an das Phosphat würde die Struktur jedoch erheblich schwächen, daher ist eine Physisorption der Si-OH-Gruppen an die CaP-Oberfläche durch Ausbildung von H-Brücken mit den Hydroxylgruppen wahrscheinlicher. Da die Silangruppen aber auch untereinander kondensieren, bilden sie so trotzdem ein stabiles Netzwerk, welches auch bei weiteren Funktionalisierungsschritten nicht abgelöst wird.

Um über die Natur der Bindung des Silans an CaP genauere Aussagen treffen zu können, wurden die Bindungen von Silizium, Phosphat und Sauerstoff mit XPS untersucht. Die Energie wurden anhand von atmosphärischem Kohlenstoff (C1s, 284.8 eV) kalibriert. Als Referenz wurde unbeschichtetes, gesputtertes CaP vermessen. Hier zeigten sich die für Hydroxylapatit und andere CaP-Modifikationen charakteristischen Signale von Calcium-, Phosphat- und Hydroxylgruppen (Abb. 4-92).

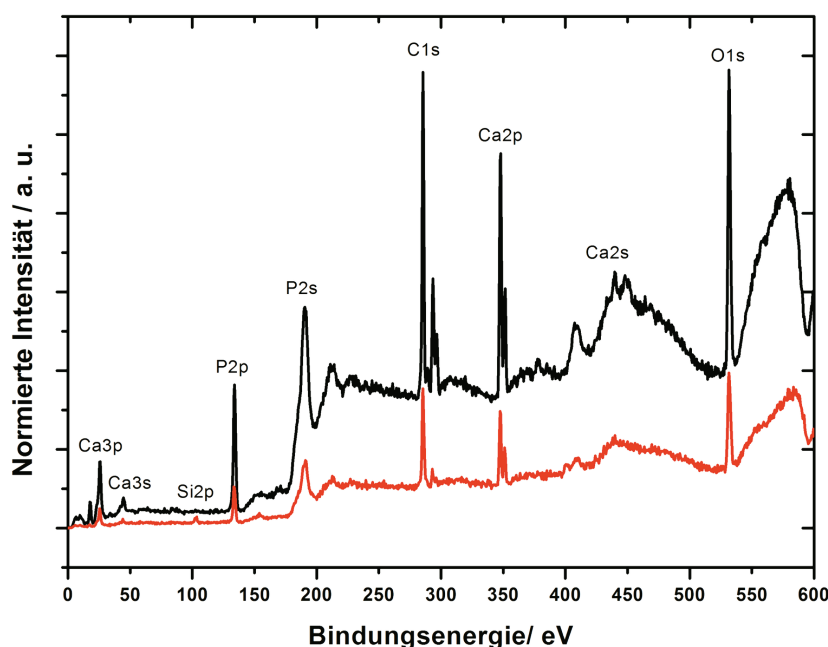


Abb. 4-92: XPS-Übersichtsspektrum von der unbeschichteten CaP-Oberfläche (schwarz) und der mit dem Aminosilan beschichteten CaP-Oberfläche (rot).

Die Peaks von Si2p, P2p und O1s wurden für Probe und Referenz normiert und gefittet (Abb. 4-93). Das Doublet-Signal für Si2p ist nur in der Probe vorhanden und liegt bei 102,2 eV.⁽³³⁶⁾ In der Referenz ist ein schwaches Signal von elementarem Silizium sichtbar (99 eV), dies stammt vom Trägermaterial, auf dem eine Gold- und CaP-Schicht aufgesputtert wurde.

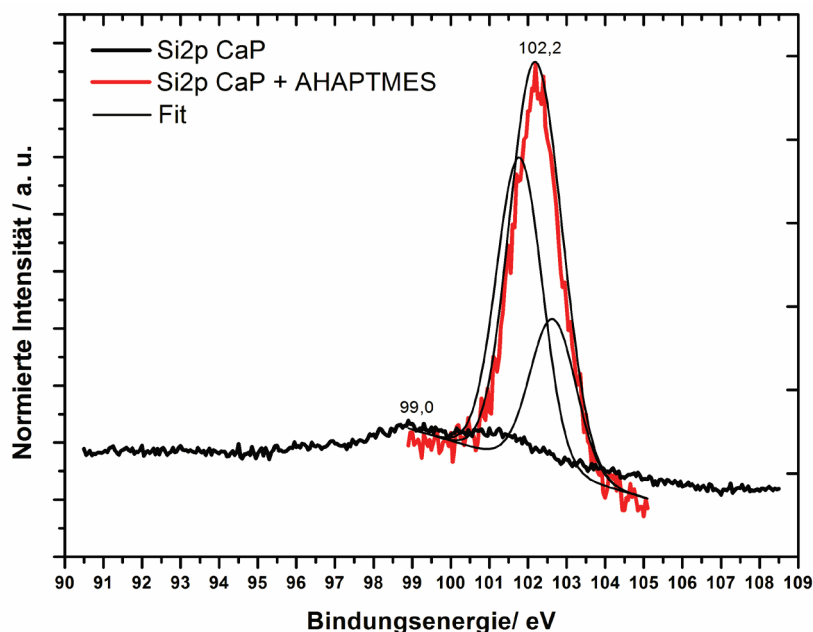


Abb. 4-93: XPS-Spektrum von Silizium 2p. Auf unbeschichteten CaP (schwarz) ist nur ein schwaches Signal des Trägermaterials Silizium bei 99 eV erkennbar, für die mit AHAPTMEs beschichtete CaP-Oberfläche (rot) das Doublet-Signal von Silizium-Sauerstoffverbindungen bei 102,2 eV.

Das Signal für die Bindungen des Siliziums mit drei Sauerstoffgruppen und einer Kohlenstoffgruppe ist sowohl im Edukt als auch in einer potentiellen Bindung an die Phosphat- oder Hydroxylgruppe gleich. Aus diesem Grund kann anhand von Si2p keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Bindung des Siliziums an Phosphat- oder Hydroxylgruppen des CaP stattfand.

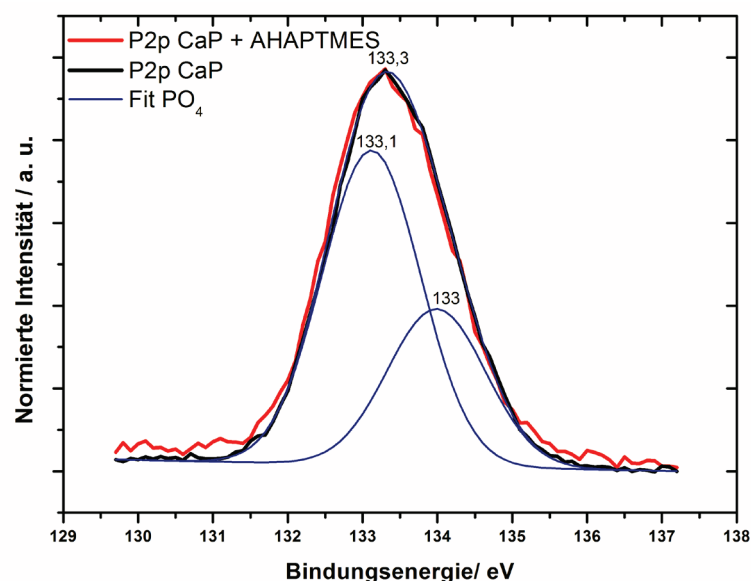


Abb. 4-94: XPS-Spektrum von $P2p$. Auf unbeschichtetem CaP (schwarz) und mit dem Aminosilan beschichteten CaP (rot) stimmt das Spektrum überein. Es gibt aus dem Spektrum keinen weiteren Hinweis auf einen anderen Oxidationszustand des Phosphors.

Das $P2p$ -Signal von unbeschichtetem CaP und beschichtetem CaP stimmt überein, die Bindungsenergie bei 133.3 eV ist der Spin-Bahnkopplung einer $P2p_{1/2}$ und $P2p_{3/2}$ Komponente zuzuordnen (Abb. 4-94).^{(336),(337)} Aus dem Signal für $P2p$ ist erkennbar, dass sich während der Reaktion keine Si-O-P-Bindung gebildet hat. Dazu würde ein Teil des Phosphors oxidiert vorliegen, diese Veränderungen des elektronischen Bindungszustands würden eine Verschiebung der Bindungsenergie zur Folge haben.

Das $O1s$ -Signal bei 531,1 eV in der Referenz kann dem Sauerstoff von Phosphat und Hydroxid von Hydroxylapatit zugeordnet werden⁽³³⁷⁾. Für andere CaP-Modifikationen ist die Bindungsenergie zu niedrigeren Werten hin verschoben (z. B. Tricalciumphosphat 530,3 eV,⁽³³⁸⁾). Ein Fit mit zwei Komponenten für Sauerstoff aus dem Phosphat und aus O-H ergab die in Abb. 4-95 dargestellten Glockenkurven. Nach der Beschichtung wird das Signal für $O1s$ breiter. Dieser Fit zeigte eine Verschiebung der Bindungsenergie von O-H zu niedrigeren Werten, was andeutet, dass ein neuer Bindungstyp auftritt, in den die O-H-Gruppen involviert sein können.

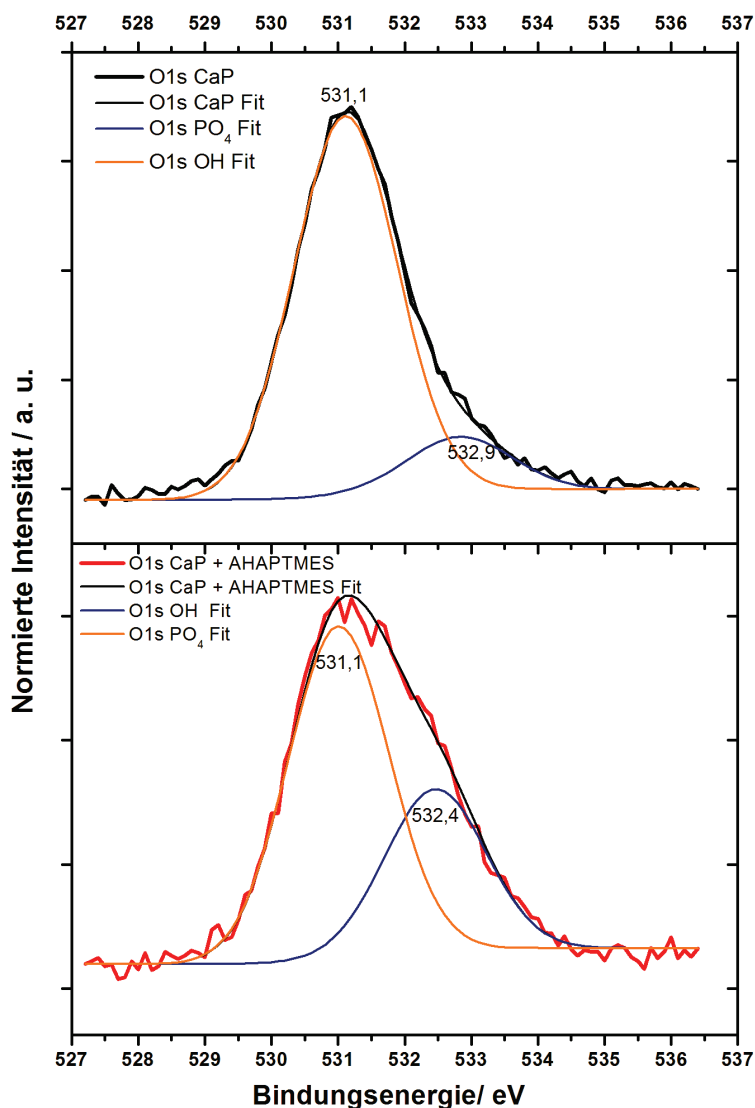


Abb. 4-95: XPS-O1s-Spektren von unbeschichtetem CaP (oben) und mit einem Aminosilan (AHAPTMS) beschichteten CaP (unten) und einem Fit mit zwei Komponenten (PO_4 und OH). Nach der Beschichtung verbreitert sich das O1s-Signal, die Bindungsenergie von OH verschiebt sich zu geringeren Werten.

Demnach sind die Hydroxylgruppen an der Oberfläche nicht mehr vorhanden oder sind in eine Wechselwirkung mit dem adsorbierten Molekül getreten. Die Verschiebung der Bindungsenergie für die O-H-Gruppe kann auf Si-O_x-Bindungen zurückzuführen sein, die während Kondensationsreaktion des Alkoxysilans entstehen. Das O1s-Signal von SiO_x wird in der Literatur mit 532,5-532,9 eV angegeben.⁽³³⁹⁾ Um dies zu berücksichtigen, wurde die Probe mit drei Komponenten bei fester und variabler Breite der Glockenkurven gefittet. Der Fit mit variabler Breite zeigte bei einer Bindungsenergie von 531,9 eV ein Signal eines Bindungstyps, der in der Referenz nicht vorhanden war (Abb. 4-96). Ein Fit der Referenzkurve (unbeschichtetes CaP) mit gleichen Randbedingungen wie in der Probe

(beschichtetes CaP) zeigte allerdings einen sehr hohen Anteil dieses unbekannten Bindungstyps in der Referenz (531,4 eV), der den Anteil des Phosphats übersteigt. Aus der Summenformel für Hydroxylapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ wird deutlich, dass dies aus stöchiometrischen Gründen nicht möglich ist. CO_3^{2-} kann die Phosphatgruppe zu einem geringen Anteil substituieren, wie aus den IRRAS-Spektren (Abb. 4-72) hervorgeht. Die Bindungsenergie des Carbonatsignals wird auch mit 531,5 eV angegeben.⁽³³⁸⁾ Trotzdem ist der aus diesem Fit der Referenz angegebene Anteil viel zu hoch für den Carbonat-Sauerstoff im Hydroxylapatit. Aus den aufgeführten Gründen, neben der Tatsache, dass der Fit auch mathematisch nicht konvergierte, können die Komponenten des O1s-Signals nicht wie in Abb. 4-96 dargestellt beschrieben werden.

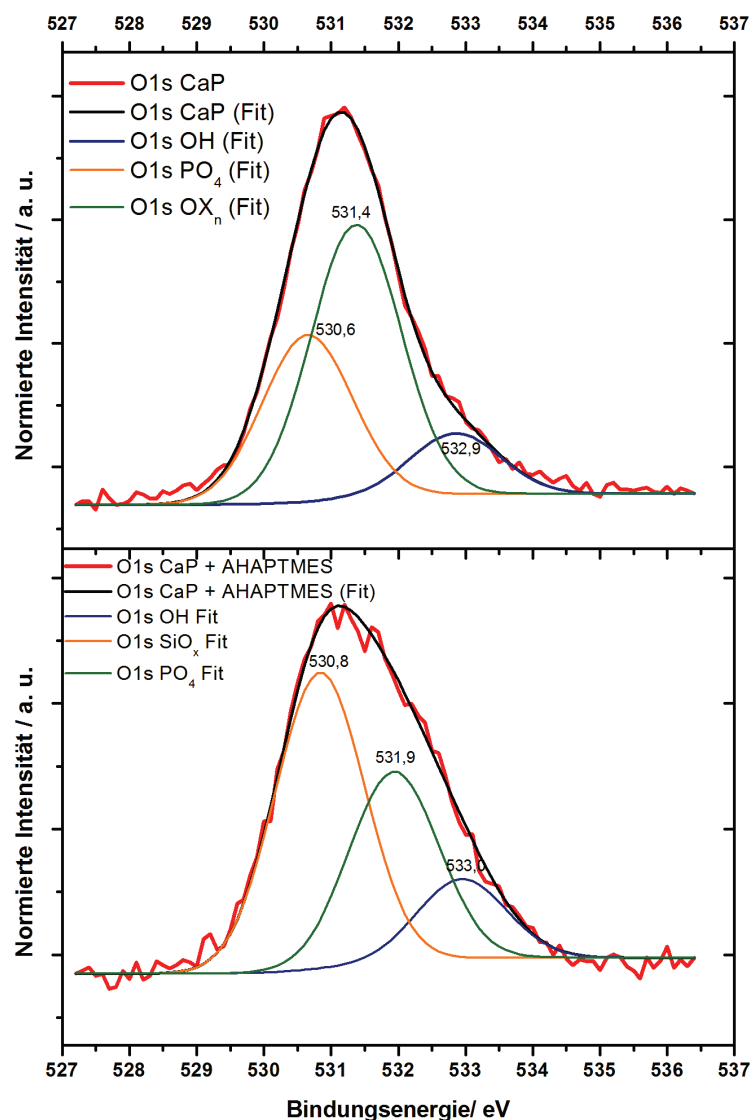


Abb. 4-96: Fit des O1s-Signals von unbeschichtetem CaP (oben) und beschichtetem CaP (unten) mit drei Komponenten mit variabler Breite. Für unbeschichtetes CaP würde sich dabei eine unbekannte Verbindung OX_n ergeben, die den Großteil der Komponente ausmacht. Der Fit konvergierte allerdings nicht.

Der Fit des beschichteten CaP mit drei Glockenkurven fester Breite zeigte ebenfalls eine geringe Komponente für Hydroxylgruppen und ein signifikantes Signal für einen neuen Bindungstyp bei 532,5 eV (Abb. 4-97). Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit der Bindungsenergie von 532,5 eV, die für SiO_x -Gruppen angegeben wird.⁽³³⁹⁾ Eine Kurvenanpassung der unbeschichteten Referenz mit den für die Probe zugrunde gelegten Fitparametern resultierten in zwei Signalen bei 531,1 eV und 532,8 eV, die der Phosphat- und Hydroxylgruppe zugeordnet werden können.

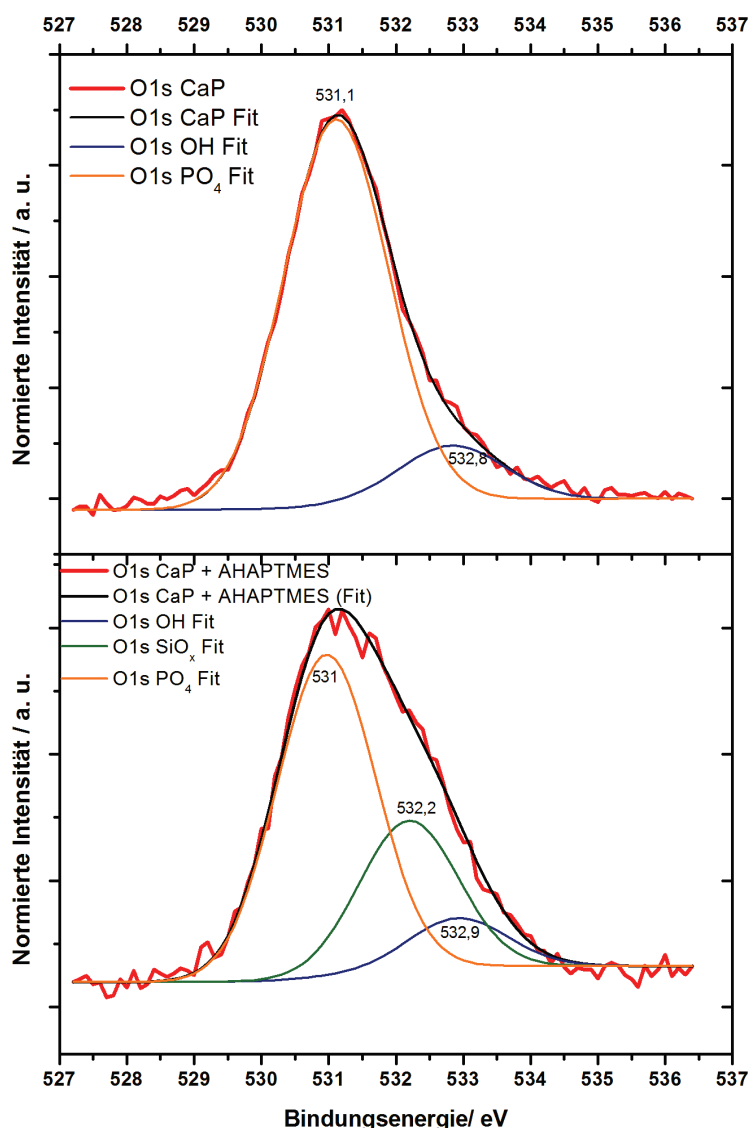


Abb. 4-97: Fit des O1s-Signals von unbeschichtetem CaP (oben) und beschichtetem CaP (unten) mit drei Komponenten fester Breite. Die Kurvenanpassung des unbeschichteten CaP resultierte in nur zwei Komponenten.

Aus den XPS-Daten kann das Verhältnis der verschiedenen Sauerstoffverbindungen errechnet werden. Der Quotient aus dem Sauerstoffanteil im Phosphat zum Sauerstoffanteil der Hydroxylgruppe aus der Summenformel für Hydroxylapatit ist

4. Der aus dem Fit der Referenz hervorgehende Quotient ergibt 7.1. Hier ist bereits ein deutlich höherer Anteil einer weiteren Sauerstoffverbindung enthalten, möglicherweise Carbonatgruppen oder Sauerstoff aus atmosphärischen Kohlenstoffverbindungen, die auch zwischen 531 – 532,5 eV Signale erzeugen. Für die Probe berechnet sich das Verhältnis wie folgt:

$$V_o \left(PO_4 / OH \right) = \frac{(7.1(1-x)) + 7.1x}{(1-x) + x(1-y) + xy + \frac{2}{F}xy} \approx 2.1 \quad (Gl. 4-6)$$

mit: x = Anteil der CaP-Oberfläche am O1s-Signal
 1-x = Volumenanteil von CaP
 y = Anteil der mit Silan belegten OH-Gruppen
 F = Korrekturfaktor für die Abschirmung der OH-Gruppen auf der Oberfläche von CaP durch die Silane mit $F = e^{\frac{-b}{\lambda}}$
 λ = Mittlere freie Weglänge, für O1s 0,75 Å ⁽³⁴⁰⁾
 b = Silanspezifische Konstante, für Silikate 1,6 Å ⁽³⁴¹⁾

Aus dem deutlich geringer gewordenen Verhältnis von Sauerstoff aus dem Phosphat zum Sauerstoff aus den OH-Gruppen auf der Oberfläche wird ebenfalls deutlich, dass eine weitere Sauerstoffverbindung zu dem Verhältnis beitragen muss. Dies kann gut durch ein Si-O_x-Netzwerk erklärt werden, welches gelegentlich an ursprünglichen O-H-Gruppen verankert ist. Es kann letztlich auf Basis der vorliegenden Daten nicht sicher gesagt werden kann, ob Si-O_x-Gruppen im Kristall z. B. PO₄ substituieren, oder ob Wasserstoffbrückenbindungen zwischen OH---O-SiR₃ auftreten. Eine Si-O-P Bindung kann auf Grundlage der Daten ausgeschlossen werden. Die Bindung des Aminosilans an das CaP ist aus der experimentellen Erfahrung nicht reversibel, das Silan wird auch durch mehrere Spülvorgänge nicht heruntergewaschen. Dies deutet zusätzlich zur XPS-Analyse auf eine Chemisorption hin, auch wenn an dieser Stelle keine zweifelsfreie Aussage über die Natur der Bindung gemacht werden kann.

Aus den vorliegenden Daten kann geschlussfolgert werden, dass die Adsorption der Biofunktionalisierung keiner verknüpfenden Silikatschicht bedarf.

Adsorption von Streptavidin

Die Adsorption von Streptavidin wurde aufgrund der in 4.5.3 gezeigten Ergebnisse in einem DMSO-PBS-Gemisch bei einem Verhältnis von 30:70 durchgeführt. Für die Vergleichsgruppen 0.5 mM / 5 mM Aminosilan konnte in einer Echtzeitkinetik eine Adsorption von Streptavidin an die biotinylierte CaP-Oberfläche beobachtet werden. Das Streptavidin blieb auch nach einem Spülvorgang mit 10 mL min⁻¹ stabil auf der

Oberfläche gebunden (Abb. 4-98). Unspezifisch physisorbiertes Streptavidin blieb bei einem Spülvorgang nicht auf der Oberfläche. Dies belegt, dass das Schichtsystem stabil auf der Oberfläche immobilisiert ist. Die Schichtdickenbestimmung nach Fitting der SPR-Scans mittels *Winspill* ergab die in Tabelle 4-6 angegebenen Werte.

Tabelle 4-6: Schichtdicken des Streptavidinmonolayers auf CaP bei initialer Funktionalisierung mit verschiedenen Aminosilankonzentrationen.

| Aminosilan [mM] | Schichtdicke [nm] |
|-----------------|-------------------|
| 0.5 | 3.8±0.1 |
| 5 | 4.5±0.2 |

Bestätigt wurden die Ergebnisse durch IRRAS-Aufnahmen, auf denen nach der Adsorption des Streptavidins für Protein charakteristische Amid-I- und -II-Banden ($1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) sowie eine größere Bande von Wasser im Protein (3300 cm^{-1}) sichtbar waren. Zudem zeigte auch die gleichbleibende Intensität der Phosphatbande, dass die CaP-Modellschicht durch den Adsorptionsvorgang nicht verändert oder abgetragen wurde.

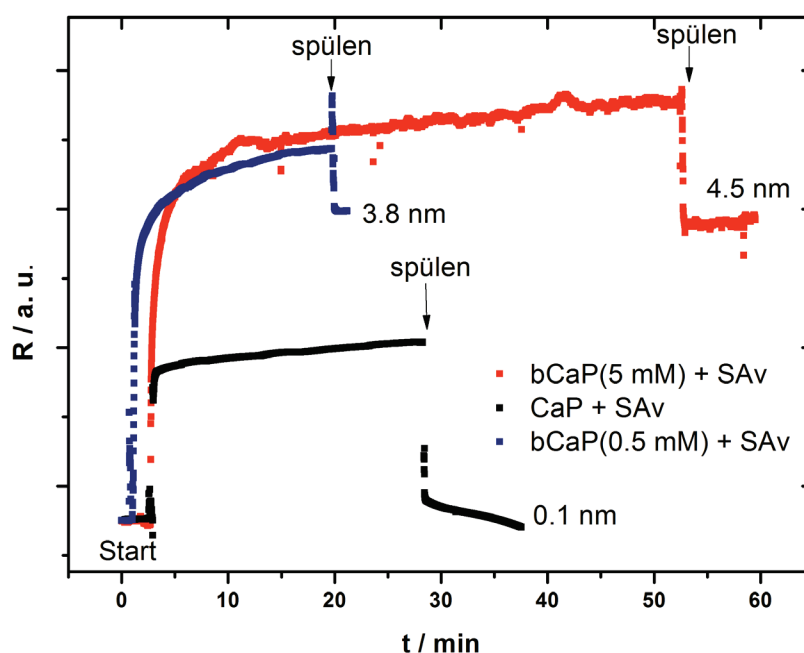


Abb. 4-98: Echtzeit-Kinetiken der Adsorption von Streptavidin (SAv) an eine unbehandelte und eine mit 0.5 mM sowie eine mit 5 mM Aminosilan und Biotin funktionalisierten CaP-Modellschicht (bCaP). Auf die unbehandelte CaP-Modellschicht konnte Streptavidin nicht irreversibel adsorbieren.

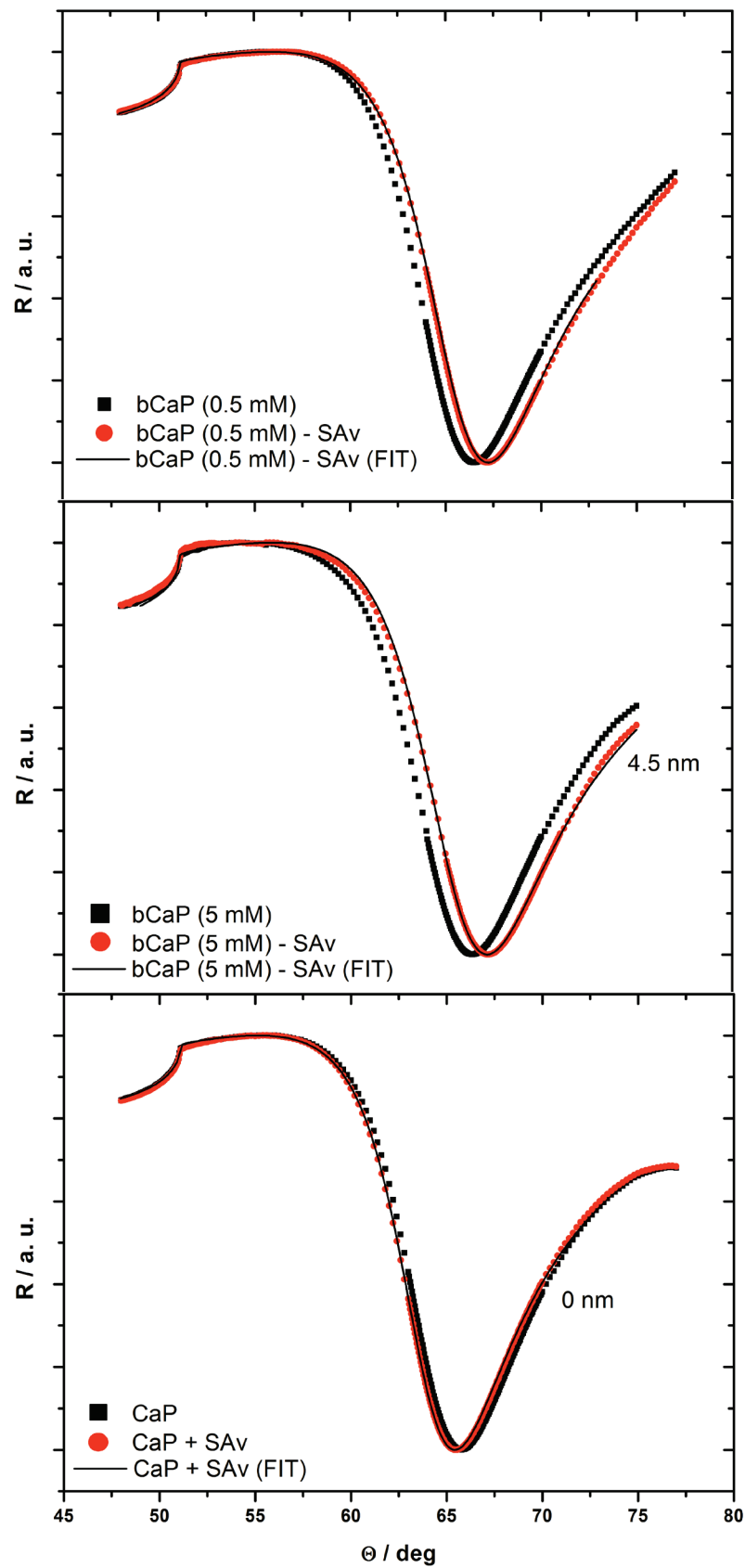


Abb. 4-99: SPR-Scans nach der Adsorption von Streptavidin an eine mit 0.5 mM und eine mit 5 mM Aminosilan und Biotin funktionalisierte CaP-Modellschicht (bCaP) sowie an eine unbehandelte CaP-Modellschicht mit den aus dem Fit resultierenden Schichtdicken.

Die Schichtdicke von Streptavidin verhielt sich proportional zur Konzentrations-
erhöhung des Aminosilans. Dies konnte sowohl aus dem Fit der SPR-Scans als auch
der Intensität der Amidbanden belegt werden. Auf TiO_x -Oberflächen konnte dieser
Effekt nicht beobachtet werden. Dort war bei der eingesetzten Konzentration und
der Adsorptionszeit von ca. 60 min bereits ein nahezu vollständiger Monolayer auf
der Oberfläche vorhanden, der Einsatz von höheren Aminosilankonzentration führte
zu keinem Schichtdickenzuwachs beim Streptavidin. Bei der Funktionalisierung von
CaP, bei welchem die Hydroxylgruppen nicht für kovalente Bindungsknüpfung zur
Verfügung stehen, scheint die Funktionalisierungseffizienz demnach stark von der
Kondensationsreaktion der Silane untereinander abzuhängen.

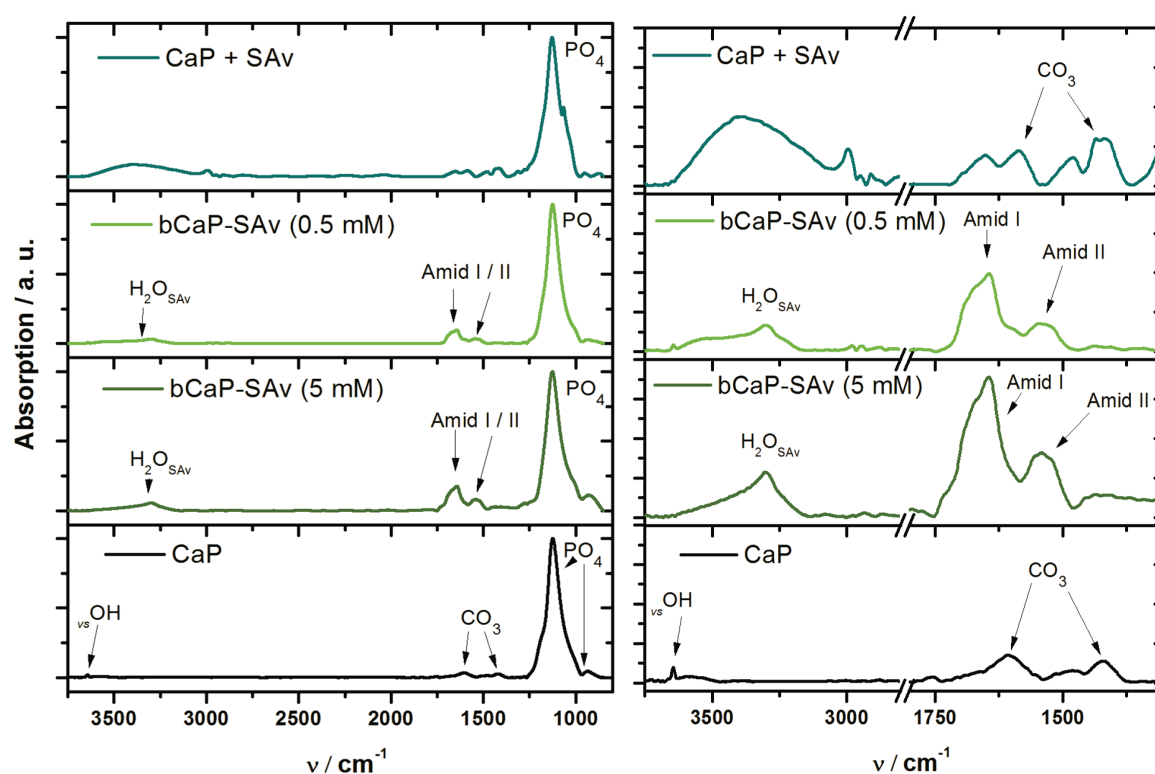


Abb. 4-100: IRRAS-Spektren einer gesputterten CaP-Modellschicht vor und nach Biofunktionalisierung mit Streptavidin. Links: Übersichtsspektrum. Rechts: 10-fache Vergrößerung der Spektren mit Darstellung der relevanten Banden der Biofunktionalisierung. Von unten nach oben: 1. unbeschichtetes CaP. 2. Adsorption von Streptavidin an eine mit 5 mM Aminosilan und Biotin funktionalisierte CaP-Schicht (bCaP). 3. Adsorption von Streptavidin an eine mit 0.5 mM Aminosilan und Biotin funktionalisierte CaP-Schicht. 4. Unspezifische Adsorption von Streptavidin an CaP. Aus der Intensität der Amidbanden ist ersichtlich, dass Streptavidin besser an mit 5 mM Aminosilan und Biotin funktionalisiertes CaP binden konnte. Eine unspezifische Bindung von Streptavidin auf CaP war vernachlässigbar.

Insgesamt konnte der Beleg erbracht werden, dass eine spezifische Biofunktionalisierung von CaP durch direkte Übertragung des molekularen Schichtsystems von TiO_x -Modellschichten mit geringfügigen Modifikationen möglich ist.

4.5.5 Übertragung des Schichtsystems auf Calciumphosphat mit einer Silikat-Schicht

Stöber-Synthese mit verschiedenen Ammoniaküberschüssen

Bei der Einführung einer Silikat-Zwischenschicht auf die CaP-Oberfläche vor der Applikation des eigentlichen Schichtsystems sollte mit Hilfe der Stöber-Synthese mit Tetraethylorthosilikat (TEOS) als Prekursor ein dünner Silikat-Layer aufgebracht werden. Diese Methode hat sich für das Coating von z. B. CaP-Nanopartikeln mit einer ultradünnen Silikat-Schicht (≈ 10 nm) bewährt, wie eine Vielzahl von Publikationen zeigen.⁽³⁴²⁾ Hierbei wird in einer ethanolischen Lösung unter basischer Katalyse das TEOS hydrolysiert, zeitgleich kondensieren die Silanolgruppen untereinander und bilden so ein Silikat-Netzwerk. Die Silikatschicht auf CaP sollte so dünn sein, dass keine Einschränkung für die biophysikalische Analytik besteht. Dies ist der Fall, wenn die Schichtdicke < 20 nm beträgt. Andernfalls ist eine Analytik mittels SPR nicht mehr möglich. Dazu wurde im Rahmen der Arbeit der Stöberprozess derart modifiziert, dass in einem Zeitraum von < 2 h eine geschlossene Silikat-Beschichtung auf einem Si-Wafer entsteht. Hierzu wurde zuerst der Anteil an Ammoniak im Reaktionsprozess schrittweise erhöht. Die resultierenden ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken und der Kontaktwinkel nach 4 h sind in Tabelle 4-7 und Abb. 4-101 dargestellt.

Tabelle 4-7: Ellipsometrisch bestimmte Silikat-Schichtdicke und Kontaktwinkel nach 1 h Reaktionszeit für verschiedene Ammoniakanteile im Reaktionsansatz (v/v) auf einem Si-Wafer.

| Ammoniakanteil in einem 50 mL Ansatz [μ L] | Silikat-Schichtdicke [nm] | Kontaktwinkel [$^{\circ}$] |
|---|---------------------------|------------------------------|
| 0 | 2.43 \pm 0.05 | 90.5 \pm 4.6 |
| 26 (0,05 %) | 2.21 \pm 0.09 | 92.4 \pm 3.4 |
| 52 (0,1 %) | 2.2 \pm 0.1 | 89.6 \pm 2.5 |
| 260 (0,5 %) | 2.8 \pm 0.15 | 89.5 \pm 8.4 |
| 2600 (5 %) | 36.5 \pm 1.7 | 30.8 \pm 2.8 |

Die Ergebnisse zeigen, dass erst durch einen 5%igen (v/v) Ammoniakanteil im Reaktionsansatz die Bildung des Silikat-Netzwerkes derart beschleunigt werden konnte, dass innerhalb von 4 h ein signifikanter Schichtdickenzuwachs erreicht wurde. Im Hinblick auf eine potentielle Applikation der Biofunktionalisierung ist es

wichtig, dass die einzelnen Beschichtungsschritte zügig durchgeführt werden können.

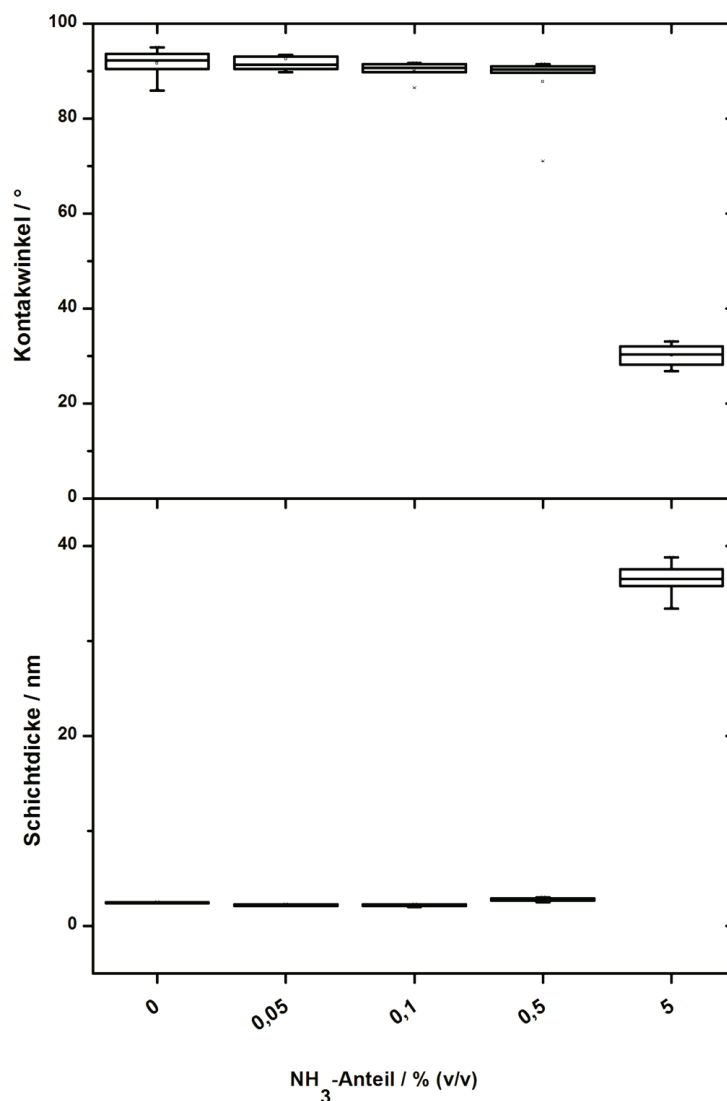


Abb. 4-101: Kontaktwinkel (oben) und Schichtdicke (unten) von Si-Wafern, die für 4 h mittels Stöber-Synthese silikatisiert wurden. Dabei wurden im Reaktionsansatz verschiedene Anteile an Ammoniak zugefügt (% v/v).

Ausgehend von 5 % Ammoniakanteil (v/v) im Stöberprozess wurde nun ermittelt, welchem kinetischen Verlauf die Bildung einer Silikat-Beschichtung folgt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 5 % Ammoniak über einen Zeitraum von 4 h zu verschiedenen Zeiten gestoppt und die Schichtdicke und der Kontaktwinkel bestimmt. Die gemessenen Schichtdicken sind in Abb. 4-102 gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Schichtdicke proportional zur Reaktionszeit zunahm. Ab ca. 4 – 16 h schwankte die Schichtdicke von Ansatz zu Ansatz zwischen 25 und 40 nm. Die Bildungsrate der Silikat-Schicht scheint hier in

eine Sättigung zu gelangen, was durch theoretische Modelle für Sol-Gel-Prozesse bestätigt wird.^{(343),(344)} Bei der Messung des Kontaktwinkels war nach 30 min Reaktionszeit ein Abfall zu beobachten, der mit andauernder Reaktionsdauer um 40° schwankte. Dieser Abfall des Kontaktwinkels ist auf die steigende Dichte an Hydroxylgruppen an der Oberfläche zurückzuführen, die durch die Hydrolyse und Kondensation des TEOS entstehen. Dadurch bestehen Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen, die Benetzbarkeit der Oberfläche steigt signifikant an.

Für die Beschichtung von CaP wurde eine Beschichtungsdauer von 1.5 h gewählt, da bei diesem Zeitraum Schichtdicken um 10 nm erstellt werden konnten.

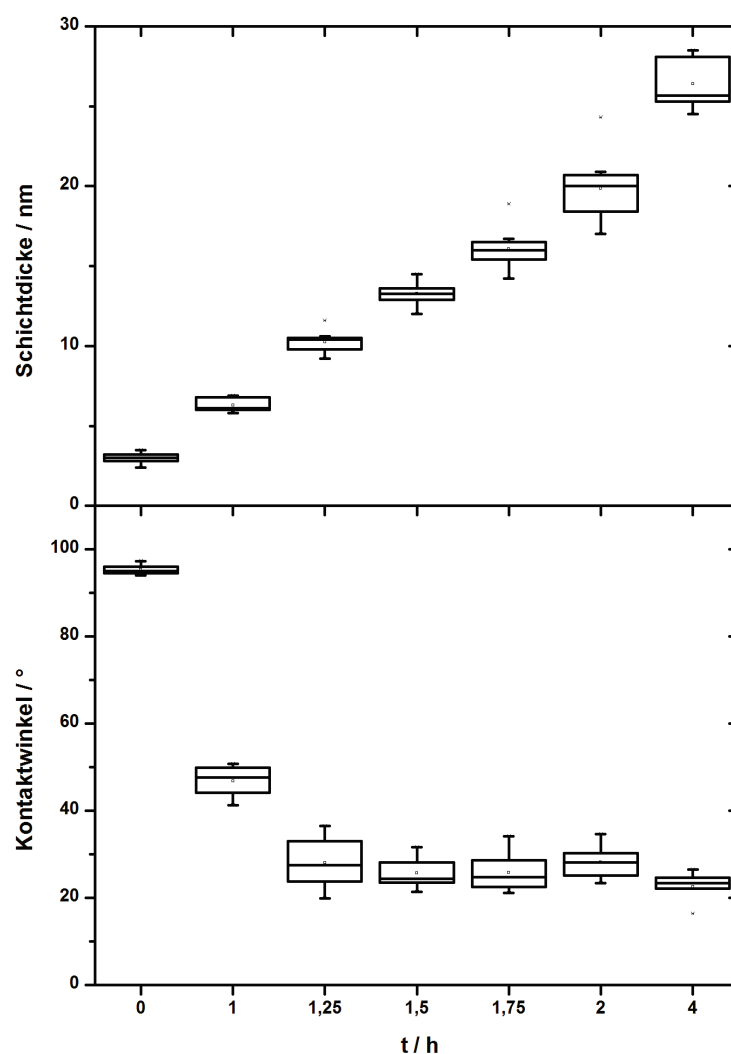


Abb. 4-102 Schichtdicke (links) und Kontaktwinkel (rechts) von Si-Wafern, die 1 bis 4 h durch Stöber-Synthese mit 5% Ammoniak im Reaktionsansatz (v/v) silikatisiert wurden.

Die beschichteten Si-Wafer-Oberflächen wurden zusätzlich im SPR und AFM analysiert. Im SPR zeigte sich für eine 8 h lang silikatisierte TiO_x -Schicht eine Schichtdickenzunahme von ca. 30 nm (Abb. 4-103).

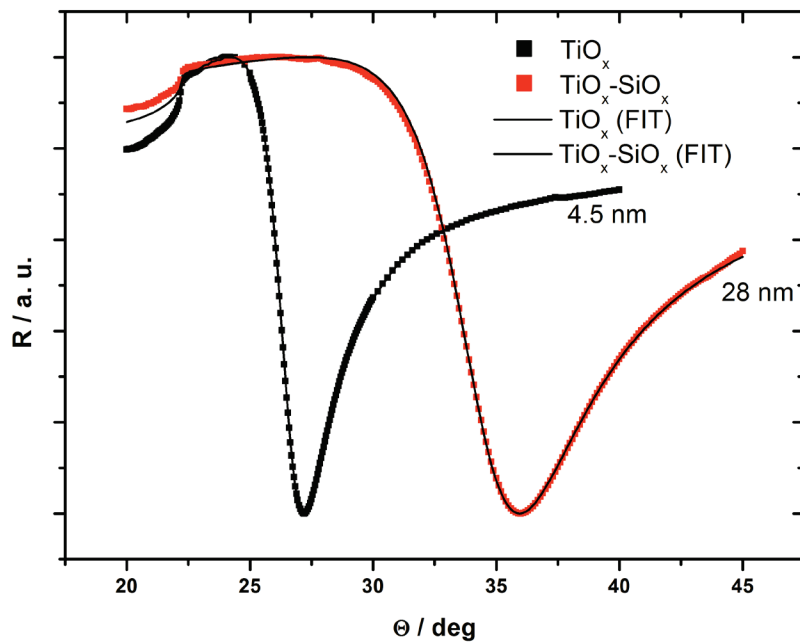


Abb. 4-103: SPR-Scan einer TiO_x -Oberfläche, die 8 h silikatisiert wurde (rot). Auch hier zeigt sich eine Schichtdicke von ca. 30 nm.

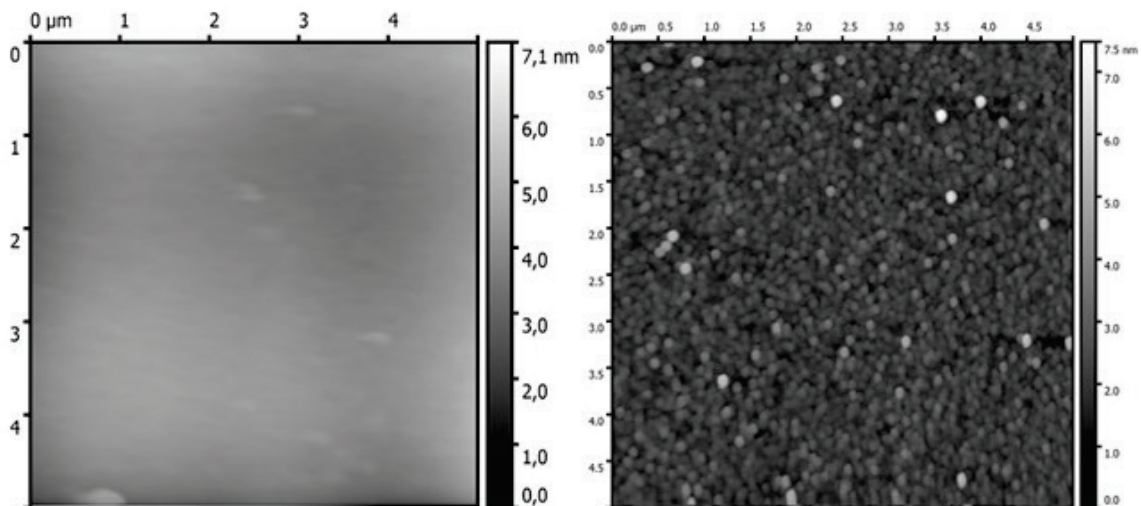


Abb. 4-104: AFM-Aufnahme eines Si-Wafers vor (links) und nach 1.5 h Stober-Synthese mit 100-facher Ammoniakkonzentration (rechts). Während des Stoberprozesses entstehen Nanopartikel von etwa 130 nm Durchmesser, die sich auf der Oberfläche absetzen. Dies findet vergleichbar auf den CaP-Modellschichten statt.

Sowohl die SPR- als auch ellipsometrischen Daten lassen keine Rückschlüsse auf die Schichtmorphologie der Oberflächenbeschichtung zu. Tatsächlich zeigen die AFM-Aufnahmen, dass durch eine Variation des Stoberprozesses keine homogenen

Silikat-Schichten erhalten werden, sondern eine geschlossene Schicht aus Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 135 ± 23 nm (Abb. 4-104). Der aus den AFM-Aufnahmen abgeleitete Partikeldurchmesser in xy-Ebene stimmt nicht mit dem Höhenprofil überein. Dies ist auf fehlende Kalibration in z-Richtung zurückzuführen. In xy-Richtung wurde das Gerät vor der Messung allerdings kalibriert. Aufgrund des Durchmessers von 135 ± 23 nm könnte angenommen werden, dass die Schichtdicke in z-Richtung ebenso groß sein müsste. Allerdings muss die Kugelform der Partikel mitberücksichtigt werden, die keine vollständig geschlossene Schicht zulässt. Die tatsächliche Schichtdicke lässt sich nach Gleichung 4-7 mit einem um den Faktor d korrigierten Partikelradius berechnen:

$$d = \frac{V_{Kugel}}{V_{Würfel}} = \frac{4}{3} \frac{\pi r^3}{(2r)^3} \approx 0,52 \quad (Gl. 4-7)$$

Wird der Partikelradius der Partikel um diesen Faktor d korrigiert, erhält man eine Schichtdicke von 70.2 ± 12 nm. Zieht man noch in Betracht, dass die Schicht nicht vollständig geschlossen ist, sind Werte zwischen 30 und 40 nm, wie sie mit SPR und Ellipsometrie bestimmt wurden, plausibel. Sowohl bei SPR-Spektroskopie als auch Ellipsometrie wird die Schichtdicke über den Laser-Messspot gemittelt.

Aus physikalischen Überlegungen heraus besitzt die Modellschicht mit dem Silikat-Layer eine größere Oberfläche als die glatte CaP-Schicht. Nimmt man einen aus den AFM-Aufnahmen abgeleiteten Partikeldurchmesser von 135 ± 23 nm an und unterstellt eine sphärische Geometrie der Silikatpartikel, dann nimmt ein Partikel eine Fläche von $14,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-3} \mu m^2$ ein. Auf 1 cm^2 passen somit $7 \pm 0,2 \cdot 10^9$ dieser Silikat-Partikel. Durch die sphärische Form der Partikel ergibt sich eine größere Oberfläche. Da die Partikel adsorbiert vorliegen, wird die Hälfte der Partikeloberfläche als die für weitere Funktionalisierungsschritte verfügbare Oberfläche angenommen. Die Oberfläche O_{HK} einer Halbkugel berechnet sich nach Gleichung 4-8:

$$O_{HK} = 2\pi r^2 = 0.0286 \pm 0.075 \mu m^2 \quad (Gl. 4-8)$$

Die Gesamtoberfläche einer vollständig mit Silikat-Partikeln bedeckten, 1 cm^2 großen CaP-Schicht beträgt demnach $2 \pm 0.06 \text{ cm}^2$. Sie ist somit doppelt so groß wie die Oberfläche der CaP-Schicht ohne Silikat-Beschichtung. Infolgedessen kann theoretisch auch die Menge an adsorbierten Molekülen und Proteinen auf der Silikat-Oberfläche um einen vergleichbaren Faktor erhöht sein. Dies würde für die

Adsorption biotinylierter Moleküle mehr Bindungsplätze zur Verfügung stellen, was im Hinblick auf eine maximale Beladungseffizienz den silikafreien Schichten vorzuziehen wäre.

Biofunktionalisierung der Silikat-beschichteten CaP-Oberfläche

Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation des Schichtsystems auch nach vorheriger Silikatisierung der Oberfläche möglich ist. Der Nachweis kann allerdings nur semiquantitativ erfolgen, da Methoden zur Quantifizierung hierbei nicht mehr eingesetzt werden konnten. Ellipsometrische Messungen streuen nach Applikation der Silikaschicht stark. Daher bewegt sich die Schichtdickenänderung nach der Biofunktionalisierung nur im Rahmen der Standardabweichung der Silikaschichtdicke. SPR-Messungen der CaP-Modelloberfläche mit darauf adsorbierter Silikat-Schicht führen bereits zu einer so drastischen Verschiebung des Resonanzminimums, dass die Detektion weiterer adsorbierter Schichten außerhalb des justierbaren Bereichs des Spektrometers liegt. Mit IRRAS konnten allerdings nach jedem Biofunktionalisierungsschritt die entsprechenden funktionellen Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 4-105).

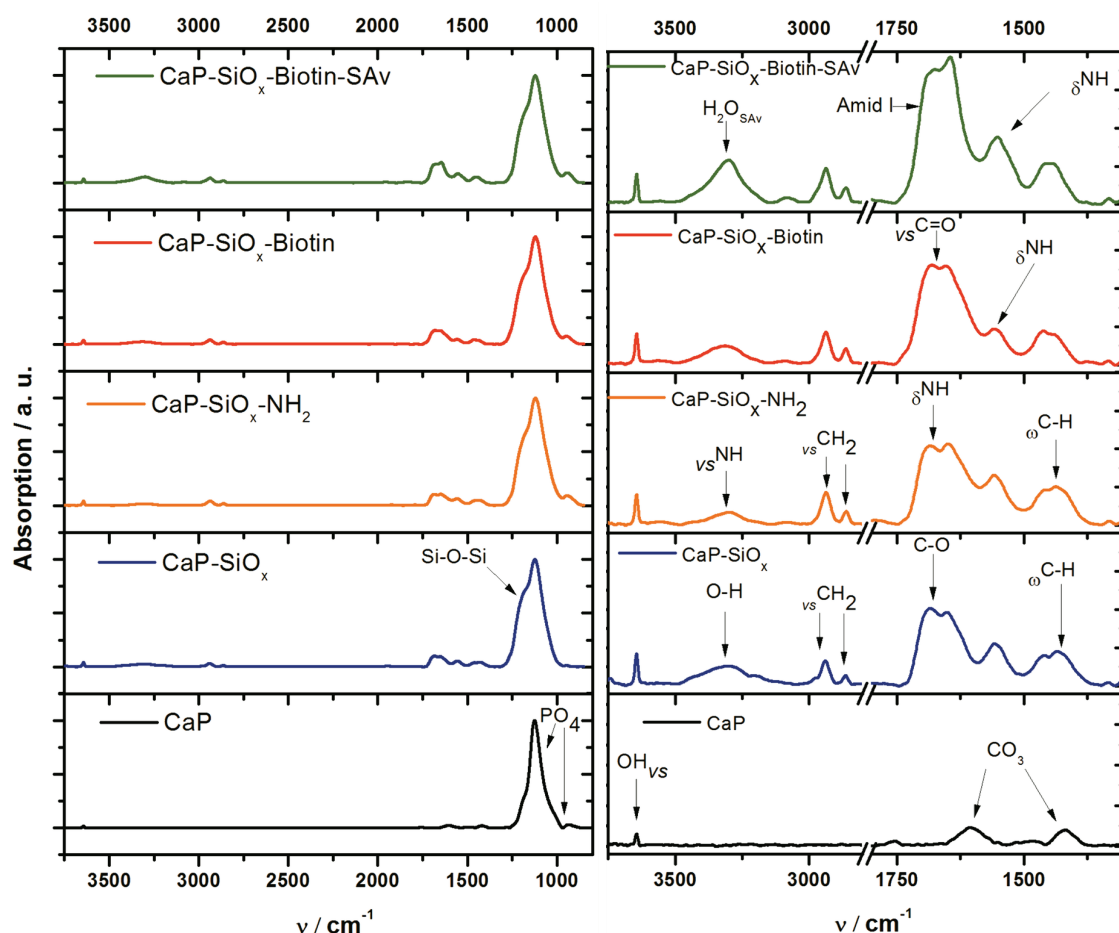


Abb. 4-105: IRRAS-Spektren der Biofunktionalisierung einer CaP-Fläche mit einer Silikat-Zwischenschicht als Übersichts- (links) und Detailspektrum (rechts). Von unten nach oben: 1. CaP-Modelloberfläche, 2. CaP nach Silikatisierung, 3. CaP nach Silikatisierung und Aminfunktionalisierung, 4. Silikatisiertes CaP nach Konjugation von Biotin an das Amin, 5. Silikatisiertes und biotinyliertes CaP nach der Adsorption von Streptavidin.

Nach Applikation der Silikat-Schicht war eine Verbreiterung der Phosphatbande zu erkennen. Dies resultierte aus einer Überlagerung der P-O-Streckschwingung mit symmetrischen und asymmetrischen Valenzschwingungen polymerisierter Si-O-Si-Gruppen. Darüber hinaus tauchten im Spektrum Signale für C-H-Valenz- und *out-of-plane*-Schwingungen (2900, 2850, 1445 cm^{-1}) sowie eine C-O-Valenzschwingung auf. Dies ist auf nicht vollständig hydrolysierte Ethylreste von TEOS zurückzuführen. Da bei der Reaktion auch Ethanol abgespalten wird, ist eine breitere O-H-Bande bei 3300 cm^{-1} sichtbar. Die scharfe O-H-Bande des CaPs veränderte sich im Zuge der Silikatisierung nicht, woraus geschlossen wurde, dass die CaP-Schicht selbst keiner Veränderung unterlag. Dies konnte durchgängig bis zur Adsorption des Streptavidins beobachtet werden. Nach Adsorption des Aminosilans verstärkten sich die Signale der C-H-Valenzschwingungen (2900, 2850 cm^{-1}) und die N-H-Deformationsschwingung der Aminogruppe des Silans wurde sichtbar (1650 cm^{-1}).

Nach Konjugation des Biotins war insbesondere die C=O-Schwingung des Biotinrings zu erkennen (1700 cm^{-1}). Die Adsorption von Streptavidin in 30:70 (v/v) DMSO:PBS-Lösung zeigte anschließend die für Proteine charakteristischen Amid-I- und -II-Banden. Zudem war im Protein gebundenes Wasser sichtbar (3400 cm^{-1}). Demnach ist die Adsorption des Schichtsystems auch mit einer Silikat-zwischenschicht an CaP möglich. Dies konnte zusätzlich durch kolorimetrische Messungen mit Streptavidin-HRP bestätigt werden (Abb. 4-106).

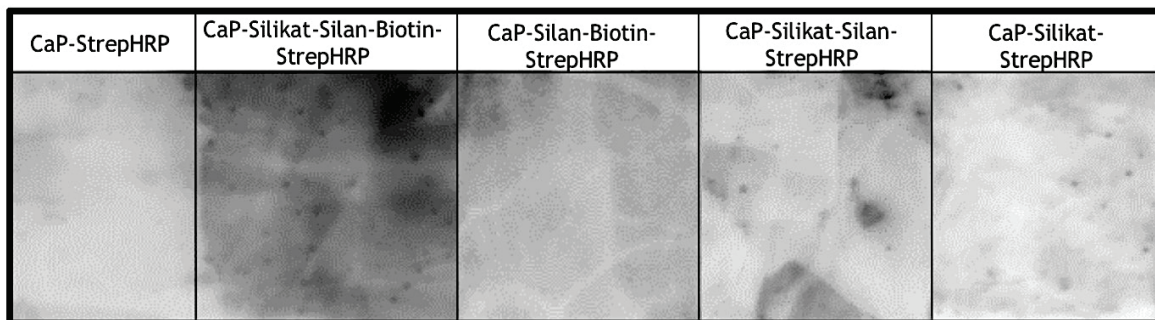


Abb. 4-106: Kolorimetrische Detektion von Strep-HRP auf verschiedenen Biofunktionalisierungen von CaP und CaP-Silikat. Deutlich zu erkennen ist die intensive Schwärzung auf CaP-Silikat. Die Schwärzung auf CaP-Silan-Biotin-StrepHRP ist aufgrund der Nutzung von PBS als Lösemittel verringert, da die darunter liegende CaP-Schicht wahrscheinlich ausgewaschen wurde.

In Übereinstimmung damit schlagen Russ et al. vor, dass durch den Einsatz von TEOS mit einem Aminosilan eine bessere Funktionalisierung von CaP erreicht wird als nur mit dem Aminosilan.⁽¹¹³⁾ Um zu bewerten, ob die Silikat-Zwischenschicht gegenüber der direkten Funktionalisierung des CaP mit der molekularen Biotin-Streptavidin-Architektur eine Verbesserung hinsichtlich der Beladungseffizienz darstellt, waren die methodischen Möglichkeiten begrenzt. Eine Silikat-Schicht auf einem Träger für das SPR verschob den Winkel des Resonanzminimums in Flüssigkeiten in einen Bereich, der nicht mehr detektiert werden konnte. Nach Applikation der Silikat-Schicht war die Streuung in der Schichtdicke zu hoch, um mit Ellipsometrie verlässliche Schichtdickenänderungen zu messen. Daher konnte nur auf eine semiquantitative Auswertung über FTIR zurückgegriffen werden. Dabei wurde die Menge an gebundenem Streptavidin über Integration der Amid-I-Bande aus zehn Ansätzen gemittelt. Die Intensität der Amid-I-Bande ist proportional zur Menge an Protein und kann daher nach Kalibrierung für die Quantifizierung eingesetzt werden. Die Ergebnisse aus Abb. 4-107 und ein Vergleich der Intensität der Amid-I-Banden zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der direkten Immobilisation des Schichtsystems mit Streptavidin und mit Silikat-Zwischenschicht auf CaP. Hierbei konnte zwar nicht die absolute

Streptavidinmenge bestimmt werden, aber die relativen Verhältnisse der Vergleichsgruppen untereinander. Demnach führt die theoretisch höhere Oberfläche auf der silikatisierten CaP-Oberfläche nicht zu einer verbesserten Adsorption von Streptavidin.

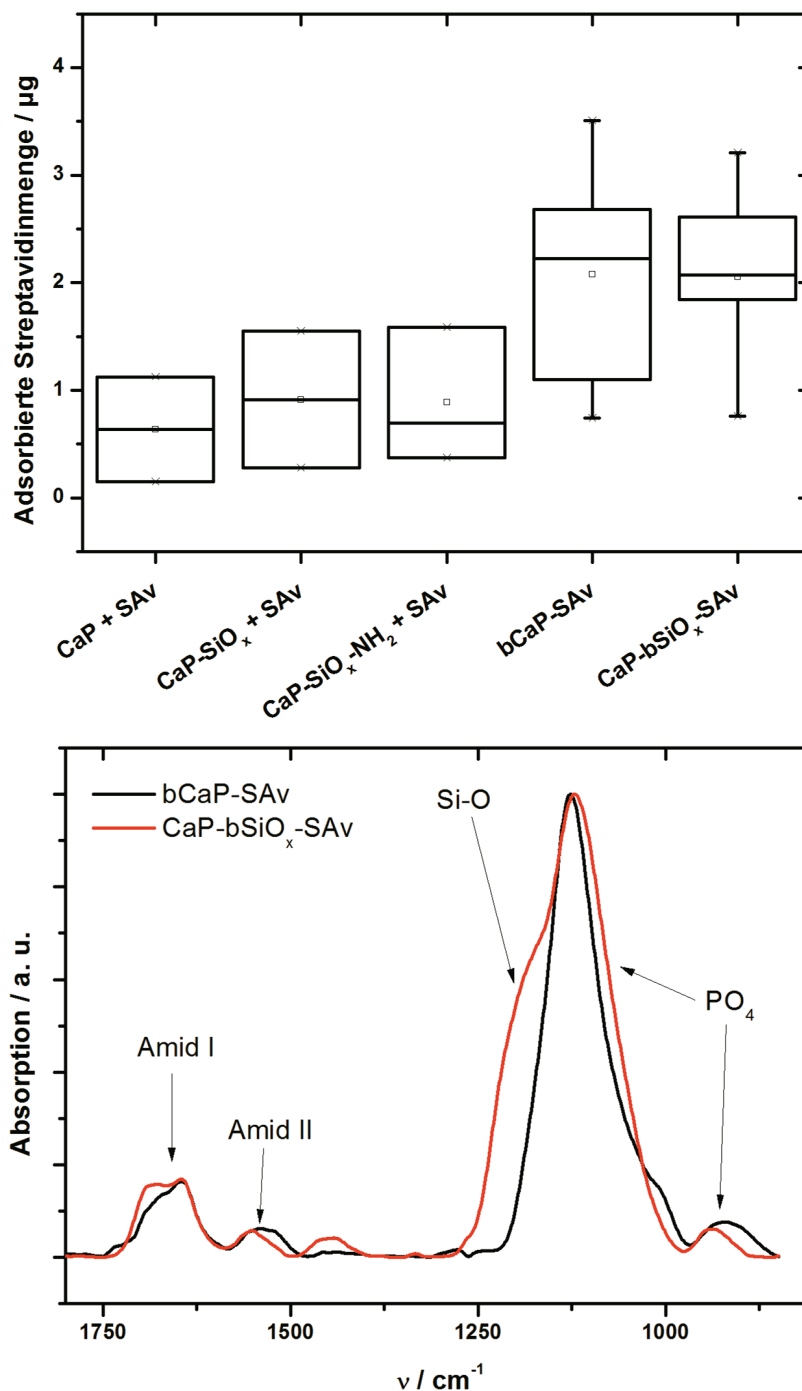


Abb. 4-107: Quantifizierung der adsorbierten Streptavidinmenge auf verschiedenen biofunktionalisierten CaP-Oberflächen mittels Integration der Amid-I-Bande. Oben: Vergleich der adsorbierten Streptavidinmenge (SAv) auf CaP, CaP mit Silikat (CaP-SiO_x), CaP mit aminfunktionalisierter Silikat-Schicht (CaP-SiO_x-NH₂), CaP funktionalisiert mit Aminosilan und Biotin (bCaP) und CaP mit biotinylierter Silikat-Schicht (CaP-bSiO_x). Der Aufbau einer Silikat-Zwischenschicht vor der Biotinylierung des CaP scheint auf die adsorbierte Menge an Streptavidin keinen Einfluss zu nehmen. Dies bestätigten auch repräsentative IR-Spektren, die eine vergleichbare Intensität der Amid-I-Banden einer CaP-Oberfläche mit und ohne Silikat-Schicht zeigten (unten).

Eine mögliche Ursache hierfür kann eine sterisch ungünstige Anordnung der Biotinkopfgruppen durch die erhöhte Rauigkeit der Oberfläche sein. Durch weiterführende Untersuchungen mit Variationen der Konzentration des Aminosilans und des Biotins kann diese Fragestellung weiter erörtert werden. Darüber hinaus sollte eine Methode zur Absolutquantifizierung der gebundenen Streptavidinmenge auf silikatbeschichteten CaP-Modelloberflächen entwickelt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Diese Arbeit befasst sich mit der Biofunktionalisierung von Implantat-Modell-oberflächen und deren Charakterisierung. Die Implantat-Modelloberflächen bestanden aus Titanoxid (TiO_x) bzw. Calciumphosphat (CaP). Die Biofunktionalisierung basierte auf einem supramolekularen Biotin-Streptavidin-System, auf das verschiedene Biomoleküle adsorbiert wurden.

Die Modelloberflächen wurden mit Hochfrequenz-Magnetron-Sputtering hergestellt; die anschließende Biofunktionalisierung beruhte auf Selbstassemblierung. Die Charakterisierung wurde mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, Ellipsometrie, Wasser-Kontaktwinkelmessungen und Fourier-transformierter Infrarotreflektionsabsorptionsspektroskopie durchgeführt. Der Biofunktionalisierungsansatz für TiO_x -Modelloberflächen wurde im Blick auf Stabilität und die Unterdrückung nicht-spezifischer Adsorptionsprozesse getestet. Um das osteoinduktive Potential zu untersuchen, wurde die Biofunktionalisierung um biotinyliertes BMP-2, BMP-2/6 und Fibronectin erweitert. Zur Ermittlung ihres Stimulationspotentials von Weichgewebe wurde biotinyliertes FGF-2 spezifisch immobilisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Streptavidin-Monolage auf TiO_x -Modelloberflächen sowohl die nicht-spezifische Adsorption von Plasmaproteinen als auch die Adsorption verschiedener Bakterien unterdrückte. Gleichzeitig war spezifische Bioaktivierung und Stimulierung humaner osteoblastärer Zellen mittels Immobilisierung von BMP-2 und BMP-2/6 sowie von mit Fibronectin kombinierten BMP-2 und BMP-2/6 möglich. Die Immobilisierung von FGF-2 resultierte in einer erhöhten Proliferation von Fibroblasten, während BMP-2 keine Fibroblasten stimulierte. Diese Ergebnisse wurden im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Herstellung multifunktionaler Implantate diskutiert.

Darüber hinaus wurden CaP-Modelloberflächen auf Möglichkeiten der Übertragung des Streptavidin-Biotin-Biofunktionalisierungsansatzes untersucht. Die Übertragung der Biotin-Streptavidin-Biofunktionalisierung auf CaP in wässrigen Lösungsmitteln schlug fehl, gelang jedoch in einem DMSO-PBS-Gemisch im

Verhältnis 30:70 (v/v). Zudem war die Streptavidinadsorption an Biotin in diesem Medium verstärkt. Die Biofunktionalisierung wurde sowohl mit als auch ohne eine stabilisierende Silikaschicht übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an adsorbiertem Streptavidin unabhängig von der Aufbringung einer Silikaschicht war. Die Bindungseigenschaften der Biofunktionalisierung auf CaP wurden mit XPS analysiert, wodurch die Möglichkeit einer Bindung an die Oberflächen-Hydroxylgruppen von CaP aufgezeigt wurde.

In zukünftigen Arbeiten soll die Übertragung dieses Biofunktionalisierungsansatzes auf verschiedene Oberflächen getestet werden. Dies könnte zu zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten in klinischen Einsatzgebieten, z. B. in der Herstellung bioinertter Katheteroberflächen, führen. Um den Sicherheitsansprüchen zu genügen, müssen toxikologische und immunologische Parameter *in vivo* untersucht werden.

Des Weiteren kann diese Biofunktionalisierung zur Herstellung von Oberflächen mit räumlich genau angeordneten Biomolekülen genutzt werden. Damit sind oberflächenkonzentrationsabhängige Untersuchungen möglich, um herauszufinden, wo die minimale und maximale Stimulationsdosis für die Zellen liegt. So kann der Überdosierung von Biomolekülen mit hohem Stimulationspotential (z. B. Wachstumsfaktoren) vorbeugt werden.

Die Biofunktionalisierung ist ein modulares System. Verschiedene Biomoleküle können in Multischichten immobilisiert werden. Dies kann zum schrittweisen Aufbau einer künstlichen extrazellulären Matrix genutzt werden, indem Proteinen mit Stützfunktion, Zytokine und Glykosaminoglykane sequentiell adsorbiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorgestellte Biofunktionalisierung eine Vielzahl zukünftiger Anwendungen sowohl in medizinischen als auch technologischen Bereichen möglich machen kann.

SUMMARY AND OUTLOOK

This work comprises the biofunctionalisation of implant model surfaces and the characterisation thereof. The implant model surfaces consisted of TiO_x , or CaP, respectively. The biofunctionalisation was based on a supramolecular biotin-streptavidin-system on which several biomolecules were adsorbed.

The model surfaces were prepared with rf-magnetron sputtering; the subsequent biofunctionalisation was based on self-assembly processes. Characterisation was performed with surface plasmon resonance spectroscopy, ellipsometry, water contact angle measurements and fourier-transformed infrared reflection absorption spectroscopy. The TiO_x model surface biofunctionalisation approach was tested with regard to stability and the suppression of nonspecific adsorption processes. To investigate the osteoinductive potential, the biofunctionalisation was extended by conjugation of biotinylated BMP-2, BMP-2/6, and fibronectin. To test its stimulation potential on soft tissue, biotinylated FGF-2 was conjugated.

The streptavidin monolayer on TiO_x model surfaces was shown to suppress nonspecific adsorption of plasma proteins as well as adsorption of several bacterial species. Simultaneously, specific bioactivation and stimulation of human osteoblastic cells was possible with immobilisation of BMP-2 and BMP-2/6, as well as BMP-2 and BMP-2/6 both combined with fibronectin. Immobilisation of FGF-2 resulted in an increased proliferation of fibroblasts while BMP-2 did not stimulate fibroblasts. These results were discussed regarding their relevance for the preparation of multifunctional implants.

Besides, CaP model surfaces were investigated with respect to transfer possibility of the streptavidin-biotin biofunctionalisation approach. Transfer of the biotin-streptavidin biofunctionalisation onto CaP failed in aqueous media but was successful in a mixture of DMSO and PBS at a ratio of 30:70 (v/v). Additionally, streptavidin adsorption to biotin was significantly enhanced in that mixture. The biofunctionalisation was transferred with and without a stabilising silica layer. The amount of adsorbed streptavidin was shown to be independent of the

implementation of a silica layer. The binding properties of the biofunctionalisation to CaP were analysed with XPS measurement, showing the possibility of a conjugation to the surface hydroxyl groups of CaP.

For future work, transfer of this biofunctionalisation approach to various surfaces should be tested. This might yield multiple applications in clinical use, e. g. for the creation of bioinert surfaces on catheters. To meet safety aspects, toxicologically and immunologically impacts have to be tested *in vivo*.

Further, this biofunctionalisation can be used for the preparation of surfaces with spatially ordered biomolecules. This makes a surface-concentration-dependent testing in order to find the minimum and maximum stimulation dose for the cells possible. Prevention of side effects due to overdosage of biomolecules with a high stimulation potency (e. g. growth factors) will be possible.

The biofunctionalisation is a modular system. Various biomolecules can be immobilised in multilayers. This can be used to create an artificial extracellular matrix consisting of structural proteins, cytokines and glycosaminoglycans.

To sum up, the presented biofunctionalisation offers a multitude of future applications in medicinal as well as technical areas.

6 LITERATUR

1. Van Noort R. Titanium: The implant material of today. *J Mater Sci*. Kluwer Academic Publishers; 1987;22:3801–11.
2. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 20:569–77.
3. Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8:609–15.
4. De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res*. Munksgaard International Publishers; 1994;5:260–4.
5. Chuang SK, Wei LJ, Douglass CW, Dodson TB. Risk factors for dental implant failure: A strategy for the analysis of clustered failure-time observations. *J Dent Res*.; 2002;81:572–7.
6. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986;1:11–25.
7. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. 2000;21:667–81.
8. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Emerg Trends Cell-Based Ther*. 2008;60:184–98.
9. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*. Blackwell Publishing Ltd; 2008;35:286–91.
10. Pye AD, Lockhart DEA, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect*. 2009;72:104–10.
11. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host Cells. *Cell*. 2006;124:715–27.
12. Ericsson I, Persson LG, Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Klinge B. Different types of inflammatory reactions in peri-implant soft tissues. *J Clin Periodontol*. Blackwell Publishing Ltd; 2005;22:255–61.
13. Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res*. 1999;13:8–20.
14. Boland T, Latour RA, Stutzenberger FJ. Molecular basis of bacterial adhesion. In: An YH, Friedman RJ editors. *Handb Bact Adhes Princ Methods, Appl*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000.
15. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater J*. 2007;23:844–54.
16. Lehnert M. Biofunktionalisierung oxidischer Titanoberflächen über eine spezifische Anbindung von biotinyliertem Fibronectin für die medizinische Anwendung. Gutenberg-Universität Mainz; 2011.
17. Kämmerer PW, Lehnert M, Al-Nawas B, Kumar V V, Hagmann S, Alshihri A, Frerich B, Veith M. Osseointegration of a specific streptavidin-biotin-fibronectin surface coating of biotinylated titanium implants - A rabbit animal study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17 Suppl 2:e601–12.
18. Gorbahn M, Klein MO, Lehnert M, Ziebart T, Brüllmann D, Köper I, Wagner W, Al-Nawas B, Veith M. Promotion of osteogenic cell response using quasicovalent immobilized fibronectin on titanium surfaces: Introduction of a novel biomimetic layer system. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70:1827–34.
19. Lehnert M, Rosin C, Knoll W, Veith M. Layer-by-layer assembly of a streptavidin-fibronectin multilayer on biotinylated TiO_x. *Langmuir*. 2013;29:1732–7.

20. Lehnert M, Gorbahn M, Rosin C, Klein M, Köper I, Al-Nawas B, Knoll W, Veith M. Adsorption and conformation behavior of biotinylated fibronectin on streptavidin-modified TiO_x-surfaces studied by SPR and AFM. *Langmuir*. 2011;27:7743–51.
21. Lehnert M, Gorbahn M, Klein M, Al-Nawas B, Köper I, Knoll W, Veith M. Streptavidin-coated TiO₂ surfaces are biologically inert: Protein adsorption and osteoblast adhesion studies. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012;100:388–95.
22. Lehnert M, Gorbahn M, Rosin C, Klein M, Köper I, Al-Nawas B, Knoll W, Veith M. Streptavidin modified TiO_x surfaces for specific bioactivation. *BioNanoMaterials*. 2011;12:13–51.
23. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett*. 2009;31:1817–24.
24. Ito Y. Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering. *Soft Matter*. 2007;4:46.
25. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893–9.
26. Treharne RW. InFUSE Bone Graft/LT-CAGE Lumbar Tapered Fusion Device. 2002.
27. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J*. 2011;11:471–91.
28. Comer GC, Smith MW, Hurwitz EL, Mitsunaga KA, Kessler R, Carragee EJ. Retrograde ejaculation after anterior lumbar interbody fusion with and without bone morphogenetic protein-2 augmentation: a 10-year cohort controlled study. *Spine J*. 2012;12:881–90.
29. Schmidt-Bleek K, Willie BM, Schwabe P, Seemann P, Duda GN. BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:141–8.
30. Kim M, Kim K, Kim J, Kim K. BMP-2 promotes oral squamous carcinoma cell invasion by inducing CCL5 release. *PLoS One*. 2014;9:e108170.
31. Pobloth A-M, Duda GN, Giesecke MT, Dienelt A, Schwabe P. High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;
32. Hajimiri M, Shahverdi S, Kamalinia G, Dinarvand R. Growth factor conjugation: Strategies and applications. *J Biomed Mater Res A*. 2014;103:819–38.
33. Masters KS. Covalent Growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration. *Macromol Biosci*. 2011;11:1149–63.
34. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:1292–309.
35. Hartl K, Voggenreiter G, Assenmacher S, Chatzinikolaïdou M, Jennissen HP, Rumpf HM. Assessment of the biological activity of chemically immobilized rhBMP-2 on titanium surfaces in vivo. *Materwiss Werksttech*. 2001;32:942–8.
36. Jennissen HP. Accelerated and improved osteointegration of implants biocoated with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Ann N Y Acad Sci*. 2002;961:139–42.
37. Wiemann M, Jennissen HP, Rumpf H, Winkler L, Chatzinikolaïdou M, Schmitz I, Bingmann D. A reporter-cell assay for the detection of BMP-2 immobilized on porous and nonporous materials. *J Biomed Mater Res*. 2002;62:119–27.
38. Even J, Eskander M, Kang J. Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012;20:547–52.
39. Beer MV. Correlation of ligand density with cell behavior on bioactive hydrogel layers. 2011.
40. Liu X, Chu P, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng R Reports*. 2004;47:49–121.
41. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23:4307–14.
42. Weissleder R, Kelly K, Sun EY, Shtatland T, Josephson L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1418–23.

43. Crouzier T, Fourel L, Boudou T, Albigés-Rizo C, Picart C. Presentation of BMP-2 from a soft biopolymeric film unveils its activity on cell adhesion and migration. *Adv Mater.* 2011;23:H111–8.
44. Ito Y, Chen G, Imanishi Y, Morooka T, Nishida E, Okabayashi Y, Kasuga M. Differential control of cellular gene expression by diffusible and non-diffusible EGF. *J Biochem.* 2001;129:733–7.
45. Hauff K, Zambarda C, Dietrich M, Halbig M, Grab AL, Medda R, Cavalcanti-Adam EA. Matrix-immobilized BMP-2 on microcontact printed fibronectin as an in vitro tool to study BMP-mediated signaling and cell migration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:62.
46. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques.* San Diego: Academic Press; 2005. 785 p.
47. Anderson SM, Chen TT, Iruela-Arispe ML, Segura T. The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF. *Biomaterials.* 2009;30:4618–28.
48. Alberti K, Davey RE, Onishi K, George S, Salchert K, Seib FP, Bornhäuser M, Pompe T, Nagy A, Werner C, Zandstra PW. Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate. *Nat Methods.* 2008;5:645–50.
49. Zhang H, Migneco F, Lin C-Y, Hollister SJ. Chemically-conjugated bone morphogenetic protein-2 on three-dimensional polycaprolactone scaffolds stimulates osteogenic activity in bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A.* 2010;16:3441–8.
50. Pohl TLM, Schwab EH, Cavalcanti-Adam EA. Covalent binding of BMP-2 on surfaces using a self-assembled monolayer approach. *J Vis Exp.* 2013;
51. Kang SM, Kong B, Oh E, Choi JS, Choi IS. Osteoconductive conjugation of bone morphogenetic protein-2 onto titanium/titanium oxide surfaces coated with non-biofouling poly(poly(ethylene glycol) methacrylate). *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75:385–9.
52. Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials.* 2002;23:2079–87.
53. He X, Ma J, Jabbari E. Effect of grafting RGD and BMP-2 protein-derived peptides to a hydrogel substrate on osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *Langmuir.* 2008;24:12508–16.
54. Schliephake H, Bötzel C, Förster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D. Effect of oligonucleotide mediated immobilization of bone morphogenic proteins on titanium surfaces. *Biomaterials.* 2012;33:1315–22.
55. Backer M V, Patel V, Jehning BT, Claffey KP, Backer JM. Surface immobilization of active vascular endothelial growth factor via a cysteine-containing tag. *Biomaterials.* 2006;27:5452–8.
56. Liberelle B, Boucher C, Chen J, Jolicoeur M, Durocher Y, Crescenzo G. Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response. *Bioconjug Chem.* 2010;21:2257–66.
57. Zhao Y, Zhang J, Wang X, Chen B, Xiao Z, Shi C, Wei Z, Hou X, Wang Q, Dai J. The osteogenic effect of bone morphogenetic protein-2 on the collagen scaffold conjugated with antibodies. *J Control Release.* 2010;141:30–7.
58. Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007;28:1027–35.
59. Ogiwara K, Nagaoka M, Cho C-S, Akaike T. Construction of a novel extracellular matrix using a new genetically engineered epidermal growth factor fused to IgG-Fc. *Biotechnol Lett.* 2005;27:1633–7.
60. Ogiwara K, Nagaoka M, Cho C-S, Akaike T. Effect of photo-immobilization of epidermal growth factor on the cellular behaviors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345:255–9.
61. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *Anz J Surg.* 2007;77:626–31.
62. Ko E, Yang K, Shin J, Cho S-W. Polydopamine-assisted osteoinductive peptide immobilization of polymer scaffolds for enhanced bone regeneration by human adipose-derived stem cells. *Biomacromolecules.* 2013;14:3202–13.

63. Chien C-Y, Tsai W-B. Poly(dopamine)-assisted immobilization of Arg-Gly-Asp peptides, hydroxyapatite, and bone morphogenetic protein-2 on titanium to improve the osteogenesis of bone marrow stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5:6975–83.
64. Nijhuis AWG, van den Beucken JJJP, Boerman OC, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. 1-Step versus 2-step immobilization of alkaline phosphatase and bone morphogenetic protein-2 onto implant surfaces using polydopamine. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19:610–9.
65. Schwab EH, Pohl TLM, Haraszti T, Schwaerzer GK, Hiepen C, Spatz JP, Knaus P, Cavalcanti-Adam EA. Nanoscale control of surface immobilized BMP-2: toward a quantitative assessment of BMP-mediated signaling events. *Nano Lett*. 2015;15:1526–34.
66. Liu Y, Huse RO, Groot K, Buser D, Hunziker EB. Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res*. 2007;86:84–9.
67. Ruhé PQ, Boerman OC, Russel FGM, Spauwen PHM, Mikos AG, Jansen JA. Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo. *J Control Release*. 2005;106:162–71.
68. Shen H, Hu X, Yang F, Bei J, Wang S. An injectable scaffold: rhBMP-2-loaded poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite microspheres. *Acta Biomater*. 2010;6:455–65.
69. Patel ZS, Yamamoto M, Ueda H, Tabata Y, Mikos AG. Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomater*. 2008;4:1126–38.
70. Bessa PC, Balmayor ER, Azevedo HS, Nürnberger S, Casal M, van Griensven M, Reis RL, Redl H. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant BMPs. Physical characterization and drug release. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;4:349–55.
71. Mercado AE, Jabbari E. Effect of encapsulation or grafting on release kinetics of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from self-assembled poly(lactide-co-glycolide ethylene oxide fumarate) nanoparticles. *Microsc Res Tech*. 2010;73:824–33.
72. Chung Y-I, Ahn K-M, Jeon S-H, Lee S-Y, Lee J-H, Tae G. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release*. 2007;121:91–9.
73. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Boussein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Jt Surg*. 2003;85:1425–35.
74. Geiger M. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55:1613–29.
75. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:329–45.
76. Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh S-P, Zegzula HD, Wozney J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res*. John Wiley & Sons, Inc; 1998;43:356–64.
77. Schroeder HE. *Pathobiologie oraler Strukturen : Zähne, Pulpa, Parodont*. Karger; 1997.
78. Arnold WH, Gängler P. *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie : 66 Tabellen*. Thieme; 2010.
79. Roghani M, Moscatellis D. Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *J Biol Chem*. 1992;267:22156–62.
80. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*. 2000;7:165–97.
81. Chlebova K, Bryja V, Dvorak P, Kozubik A, Wilcox WR, Krejci P. High molecular weight FGF-2: the biology of a nuclear growth factor. *Cell Mol Life Sci*. NIH Public Access; 2009;66:225–35.
82. Florkiewicz RZ, Sommer A. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 1989;86:3978–81.
83. Herr AB, Ornitz DM, Sasisekharan R, Venkataraman G, Waksman G. Heparin-induced self-association of fibroblast growth factor-2. Evidence for two oligomerization processes. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 1997;272:16382–9.

84. Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol.* 2005;287:390–402.
85. Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:139–49.
86. Bramono DS, Murali S, Rai B, Ling L, Poh WT, Lim ZX, Stein GS, Nurcombe V, van Wijnen AJ, Cool SM. Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Bone.* 2012;50:954–64.
87. Xu R, Rudd TR, Hughes AJ, Siligardi G, Fernig DG, Yates EA. Analysis of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) signalling network with heparin as coreceptor: evidence for the expansion of the core FGFR signalling network. *FEBS J.* 2013;280:2260–70.
88. Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest.* 2001;108:169–73.
89. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991;64:841–8.
90. Klagsbrun M, Baird A. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell.* 1991;67:229–31.
91. Harmer NJ. Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signalling: Figure 1. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:442–5.
92. Rusnati M, Coltrini D, Caccia P, Dell'Era P, Zoppetti G, Oreste P, Valsasina B, Presta M. Distinct role of 2-O-, N-, and 6-O-sulfate groups of heparin in the formation of the ternary complex with basic fibroblast growth factor and soluble FGF receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203:450–8.
93. Jastrebova N, Vanwildemeersch M, Rapraeger AC, Giménez-Gallego G, Lindahl U, Spillmann D. Heparan sulfate-related oligosaccharides in ternary complex formation with fibroblast growth factors 1 and 2 and their receptors. *J Biol Chem.* 2006;281:26884–92.
94. Kwan C, Venkataraman G, Raman Z, Liu D, Qi Y, Varticovski L, Sasisekharan R. Probing fibroblast growth factor dimerization and role of heparin-like glycosaminoglycans in modulating dimerization and signaling. *J Biol Chem.* 2001;276:23421.
95. Venkataraman G, Sasisekharan V, Herr AB, Ornitz DM, Waksman G, Cooney CL, Langer R, Sasisekharan R. Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences;* 1996;93:845–50.
96. Davis JC, Venkataraman G, Shriver Z, Raj PA, Sasisekharan R. Oligomeric self-association of basic fibroblast growth factor in the absence of heparin-like glycosaminoglycans. *Biochem J. Portland Press Ltd;* 1999;341 (Pt 3):613–20.
97. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova A V, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell.* 2000;6:743–50.
98. Blundell T, Ilag L, Mulloy B, Pellegrini L, Robinson C, Blundell T. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. *J Mol Biol. Academic Press;* 2004;339:821–34.
99. Sarabipour S, Hristova K. Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nat Commun. Nature Publishing Group;* 2016;7:10262.
100. Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol.* 1986;128:475–84.
101. Damon DH, Lobb RR, D'Amore PA, Wagner JA. Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *J Cell Physiol.* 1989;138:221–6.
102. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol. Blackwell Science Ltd;* 2002;29:197–212.
103. Daugaard H, Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K. Bone growth enhancement *in vivo* on press-fit titanium alloy implants with acid etched microtexture. *J Biomed Mater Res Part A. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company;* 2008;87A:434–40.

104. Campbell AA. Bioceramics for implant coatings. *Mater Today*. 2003;6:26–30.
105. Epple M. Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Vieweg+Teubner Verlag; 2013.
106. de Groot K, Wolke JGC, Jansen JA. Calcium phosphate coatings for medical implants. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 1998;212:137–47.
107. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—a review. *Acta Biomater*. 2014;10:557–79.
108. Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:234–48.
109. Ginebra M-P, Canal C, Espanol M, Pastorino D, Montufar EB. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:1090–110.
110. Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J Control Release*. 2006;113:102–10.
111. van der Meer SB, Knuschke T, Frede A, Schulze N, Westendorf AM, Epple M. Avidin-conjugated calcium phosphate nanoparticles as a modular targeting system for the attachment of biotinylated molecules in vitro and in vivo. *Acta Biomater*. 2017;
112. Baeza A, Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M. Biotinylation of silicon-doped hydroxyapatite: a new approach to protein fixation for bone tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2010;6:743–9.
113. Russo L, Taraballi F, Lupo C, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Sandri M, Tampieri A, Nicotra F, Cipolla L. Carbonate hydroxyapatite functionalization: a comparative study towards (bio)molecules fixation. *Interface Focus*. 2014;4:20130040.
114. Vasiliev AN, Zlotnikov E, Khinast JG, Riman RE. Chemisorption of silane compounds on hydroxyapatites of various morphologies. *Ser Mater*. 2008;58:1039–42.
115. Dupraz AMP, de Wijn JR, v. d. Meer SAT, Groot K. Characterization of silane-treated hydroxyapatite powders for use as filler in biodegradable composites. *J Biomed Mater Res*. John Wiley & Sons, Inc; 1996;30:231–8.
116. Yang C, Cheng K, Weng W, Yang C. Immobilization of RGD peptide on HA coating through a chemical bonding approach. *J Mater Sci Mater Med*. Springer US; 2009;20:2349–52.
117. Hsiao VKS, Waldeisen JR, Zheng Y, Lloyd PF, Bunning TJ, Huang TJ, Zhang XH, Zhang M, Ferrari M, Declerck P, Farias PAM, Valera FS, Grant DH, Ozsoz M, Flair MN. Aminopropyltriethoxysilane (APTES)-functionalized nanoporous polymeric gratings: fabrication and application in biosensing. *J Mater Chem*. 2007;17:4896.
118. Zurlinden K, Laub M, Jennissen HP. Chemical functionalization of a hydroxyapatite based bone replacement material for the immobilization of proteins. *Materwiss Werksttech*. 2005;36:820–7.
119. Schickle K, Zurlinden K, Bergmann C, Lindner M, Kirsten A, Laub M, Telle R, Jennissen H, Fischer H. Synthesis of novel tricalcium phosphate-bioactive glass composite and functionalization with rhBMP-2. *J Mater Sci Mater Med*. Springer US; 2011;22:763–71.
120. Epple M. Biomaterialien und Biomineralisation. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; 2003.
121. Yang CL, Weng WJ, Du PY, Shen G, Han GR. XPS studies of hydroxyapatite powders by grafting octadecyltrichlorosilane. *Key Eng Mater*. 2007;330–332:765–8.
122. Drouet C, Christophe. Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds. *Biomed Res Int*. 2013;2013:490946.
123. Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *J Biomed Mater Res*. John Wiley & Sons, Inc.; 2001;58:570–92.
124. Nelea V, Morosanu C, Iliescu M, Mihailescu IN. Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and radio-frequency magnetron sputtering: comparative study. *Appl Surf Sci*. 2004;228:346–56.
125. Rahmany MB, van Dyke M. Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomater*. 2013;9:5431–7.
126. Wang C, Ma J, Cheng W, Zhang R. Thick hydroxyapatite coatings by electrophoretic deposition. *Mater Lett*. 2002;57:99–105.

127. Yang G-L, He F-M, Hu J, Wang X, Zhao S-F. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:782–9.
128. Piveteau LD, Girona MI, Schlappbach L, Barboux P, Boilot JP, Gasser B. Thin films of calcium phosphate and titanium dioxide by a sol-gel route: a new method for coating medical implants. *J Mater Sci Mater Med.* 1999;10:161–7.
129. Tkalcec E, Sauer M, Nonninger R, Schmidt H. Sol-gel-derived hydroxyapatite powders and coatings. *J Mater Sci.* Kluwer Academic Publishers; 2001;36:5253–63.
130. Surmeneva MA, Surmenev RA, Nikonova YA, Selezneva II, Ivanova AA, Putlyayev VI, Prymak O, Eppele M. Fabrication, ultra-structure characterization and in vitro studies of RF magnetron sputter deposited nano-hydroxyapatite thin films for biomedical applications. *Appl Surf Sci.* 2014;317:172–80.
131. Surmeneva MA, Chaikina M V, Zaikovskiy VI, Pichugin VF, Buck V, Prymak O, Eppele M, Surmenev RA. The structure of an RF-magnetron sputter-deposited silicate-containing hydroxyapatite-based coating investigated by high-resolution techniques. *Surf Coatings Technol.* 2013;218:39–46.
132. Ueda K, Kawasaki Y, Narushima T, Goto T, Kurihara J, Nakagawa H, Kawamura H, Taira M. Calcium phosphate films with/without heat treatments fabricated using RF magnetron sputtering. *J Biomech Sci Eng.* 2009;4:392–403.
133. Jansen JA, Wolke JG, Swann S, Van der Waerden JP, de Groot K. Application of magnetron sputtering for producing ceramic coatings on implant materials. *Clin Oral Implants Res.* 1993;4:28–34.
134. Surmenev RA, Surmeneva MA, Evdokimov KE, Pichugin VF, Peitsch T, Eppele M. The influence of the deposition parameters on the properties of an rf-magnetron-deposited nanostructured calcium phosphate coating and a possible growth mechanism. *Surf Coatings Technol.* 2011;205:3600–6.
135. Yokota S, Nishiwaki N, Ueda K, Narushima T, Kawamura H, Takahashi T. Evaluation of thin amorphous calcium phosphate coatings on titanium dental implants deposited using magnetron sputtering. *Implant Dent.* 2014;23:343–50.
136. Ivanova AA, Surmeneva MA, Grubova IY, Sharonova AA, Pichugin VF, Chaikina M V., Buck V, Prymak O, Eppele M, Surmenev RA. Influence of the substrate bias on the stoichiometry and structure of RF-magnetron sputter-deposited silver-containing calcium phosphate coatings. *Materwiss Werksttech.* 2013;44:218–25.
137. Wolke JGC, van Dijk K, Schaeken HG, de Groot K, Jansen JA. Study of the surface characteristics of magnetron-sputter calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res.* 1994;28:1477–84.
138. Surmeneva MA, Surmenev RA, Pichugin VF, Chernousova S, Eppele M. In-vitro investigation of magnetron-sputtered coatings based on silicon-substituted hydroxyapatite. *J Surf Investig x-ray, synchrotron neutron Tech.* 2011;5:1202–7.
139. Pichugin VF, Surmeneva MA, Surmenev RA, Khlusov IA, Eppele M. Study of physicochemical and biological properties of calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering of silicon-substituted hydroxyapatite. *J Surf Investig X-ray, Synchrotron Neutron Tech.* 2011;5:863–9.
140. Edreira ERU, Wolke JGC, Aldosari AA, Al-Johany SS, Anil S, Jansen JA, Van Den Beucken JJJP. Effects of calcium phosphate composition in sputter coatings on in vitro and in vivo performance. *J Biomed Mater Res Part A.* 2015;103:300–10.
141. Surmeneva MA, Surmenev RA, Pichugin VF, Koval' NN, Teresov AD, Ivanova AA, Grubova IY, Ignatov VP, Primak O, Eppele M. Adhesion properties of a silicon-containing calcium phosphate coating deposited by RF magnetron sputtering on a heated substrate. *J Surf Investig X-ray, Synchrotron Neutron Tech.* 2013;7:944–51.
142. Wolke JGC, van der Waerden JPCM, Groot K, Jansen JA. Stability of radiofrequency magnetron sputtered calcium phosphate coatings under cyclically loaded conditions. *Biomaterials.* 1997;18:483–8.
143. Wolke J. In vivo dissolution behavior of various RF magnetron-sputtered Ca-P coatings on roughened titanium implants. *Biomaterials.* 2003;24:2623–9.

144. Yoshinari M, Hayakawa T, Wolke JG, Nemoto K, Jansen JA. Influence of rapid heating with infrared radiation on RF magnetron-sputtered calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:60–7.
145. Liebermann T, Knoll W. Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloids Surfaces A* 2000;171:115–30.
146. Dostálek J, Knoll W. Biosensors based on surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy. *Biointerphases.* 2008;3:FD12-FD22.
147. Schasfoort RBM, Tudos AJ. *Handbook of Surface Plasmon Resonance.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2008.
148. Fang Yu, Björn Persson, Stefan Löfås and, Wolfgang Knoll. Attomolar sensitivity in bioassays based on surface plasmon fluorescence spectroscopy. American Chemical Society ; 2004;
149. Mendelsohn R, Flach CR. Infrared Reflection – Absorption spectrometry of monolayer films at the air – water interface.
150. Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.* American Physical Society; 1986;56:930–3.
151. Nölting B. *Methods in modern biophysics.* 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2009.
152. Yuan Y, Lee TR. *Contact angle and wetting properties.* Springer Berlin Heidelberg; 2013.
153. Green NM. A spectrophotometric assay for avidin and biotin based on binding of dyes by avidin. *Biochem J.* 1965;94:23C–24C.
154. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci;* 2012;4:429–34.
155. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:3116–20.
156. Lottspeich F, Engels J. *Bioanalytik.* Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag; 2012.
157. Berg JM, Jeremy M, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 7th ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg; 2013. 1196 p.
158. Baroch P, Musil J, Vlcek J, Nam KH, Han JG. Reactive magnetron sputtering of TiO_x films. *Surf Coatings Technol.* 2005;193:107–11.
159. Haynes WM. *CRC handbook of chemistry and physics.* 95th ed. CRC press; 2014.
160. Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. A Survey of structure–property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir.* 2001;17:5605–20.
161. Subramanian A, Irudayaraj J, Ryan T. Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors Actuators B Chem.* 2006;114:192–8.
162. Brown AA, Khan NS, Steinbock L, Huck WTS. Synthesis of oligo(ethylene glycol) methacrylate polymer brushes. *Eur Polym J.* 2005;41:1757–65.
163. Halder J, Weight AK, Klivanov AM. Preparation, application and testing of permanent antibacterial and antiviral coatings. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2007;2:2412–7.
164. Lawrence A-M, Besir HUS. Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *J Vis Exp.* 2009;
165. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1999;287:103–15.
166. Saremba S, Nickel J, Seher A, Kotzsch A, Sebald W, Mueller TD. Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J.* 2008;275:172–83.
167. Petersen B, Petersen T, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol.* 2009;9:51.
168. Huang X, Miller W. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv Appl Math.* 1991;12:337–57.

169. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25:1605–12.
170. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. 2009.
171. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
172. Gravel P. Protein blotting by the semidry method. 2009.
173. Barth A, Zscherp C. What vibrations tell about proteins. *Q Rev Biophys.* 2002;35:369–430.
174. Goormaghtigh E, Cabiaux V, Ruyschaert JM. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Subcell Biochem.* 1994;23:405–50.
175. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys.* 2007;39:549–59.
176. Susi H, Byler DM. Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods Enzymol.* 1986;130:290–311.
177. Susi H, Byler DM. Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;115:391–7.
178. Zhao H, Brown PH, Schuck P. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys J.* 2011;100:2309–17.
179. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
180. Li Y-C, Ho I-H, Ku C-C, Zhong Y-Q, Hu Y-P, Chen Z-G, Chen C-Y, Lin W-C, Zulueta MML, Hung S-C, Lin M-G, Wang C-C, Hsiao C-D. Interactions that influence the binding of synthetic heparan sulfate based disaccharides to fibroblast growth factor-2. *ACS Chem Biol.* 2014;9:1712–7.
181. Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell.* 2000;101:413–24.
182. Moy FJ, Seddon AP, Böhlen P, Powers R. High-resolution solution structure of basic fibroblast growth factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 1996;35:13552–61.
183. Knobloch JE, Shaklee PN. Absolute molecular weight distribution of low-molecular-weight heparins by size-exclusion chromatography with multiangle laser light scattering detection. *Anal Biochem.* 1997;245:231–41.
184. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* 1968;26:62–9.
185. Zhang J, Li M, Feng Z, Chen J, Li C. UV Raman spectroscopic study on TiO₂ I. phase transformation at the surface and in the bulk. *J Phys Chem B.* 2006;110:927–35.
186. Borrás A, López C, Rico V, Gracia F, González-Elipe AR, Richter E, Battiston G, Gerbasi R, McSporran N, Sauthier G, E. György A, Figueras A. Effect of visible and UV illumination on the water contact angle of TiO₂ thin films with incorporated nitrogen. *J Phys Chem C.* 2007;111:1801–8.
187. Polyak B, Geresh S, Marks RS. Synthesis and characterization of a biotin-alginate conjugate and its application in a biosensor construction. *Biomacromolecules.* 2004;5:389–96.
188. Balan V, Petrache IA, Popa MI, Butnaru M, Barbu E, Tsibouklis J, Verestiuc L. Biotinylated chitosan-based SPIONs with potential in blood-contacting applications. *J Nanoparticle Res.* 2012;14.
189. Sugimura H, Hozumi A, Kameyama T, Takai O. Organosilane self-assembled monolayers formed at the vapour/solid interface. *Surf Interface Anal.* 2002;34:550–4.
190. Williams EH, Davydov A V., Motayed A, Sundaresan SG, Bocchini P, Richter LJ, Stan G, Steffens K, Zangmeister R, Schreifels JA, Rao M V. Immobilization of streptavidin on 4H-SiC for biosensor development. *Appl Surf Sci.* 2012;258:6056–63.

191. Janssen D, De Palma R, Verlaak S, Heremans P, Dehaen W. Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide. *Thin Solid Films*. 2006;515:1433–8.
192. Pérez-Luna VH, O'Brien MJ, Opperman KA, Hampton PD, López GP, Lisa A, Klumb A, Stayton PS. Molecular recognition between genetically engineered streptavidin and surface-bound biotin. American Chemical Society; 1999;
193. Bhushan B, Tokachichu DR, Keener MT, Lee SC. Morphology and adhesion of biomolecules on silicon based surfaces. *Acta Biomater*. 2005;1:327–41.
194. Pinho AC, Piedade AP. Zeta potential, contact angles, and AFM imaging of protein conformation adsorbed on hybrid nanocomposite surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5:8187–94.
195. Scheuring S, Muller DJ, Ringler P, Heymann JB, Engel A. Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope. *J Microsc*. 1999;193:28–35.
196. Hendrickson WA, Pähler A, Smith JL, Satow Y, Merritt EA, Phizackerley RP. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2190–4.
197. Jenney CR, Anderson JM. Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *J Biomed Mater Res*. 2000;49:435–47.
198. Chapman RG, Ostuni E, Liang MN, Meluleni G, Kim E, Yan L, Pier G, H. Shaw Warren A, Whitesides GM. Polymeric thin films that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacteria. American Chemical Society; 2001;
199. Ostuni E, Chapman RG, Liang MN, Meluleni G, Pier G, Donald E. Ingber A, Whitesides GM. Self-Assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells. American Chemical Society; 2001;
200. Chapman RG, Ostuni E, Takayama S, Holmlin RE, Yan L, Whitesides GM. Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins. *J Am Chem Soc*. 2000;122:8303–4.
201. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1998;43:338–48.
202. Bleuler-Martinez S, Schmieder S, Aebi M, Kunzler M. Biotin-binding proteins in the defense of mushrooms against predators and parasites. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:8485–7.
203. Bayer EA, Kulik T, Adar R, Wilchek M. Close similarity among streptavidin-like, biotin-binding proteins from *Streptomyces*. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1263:60–6.
204. Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol*. 14:205–24.
205. Ciardi JE, Rölla G, Bowen WH, Reilly JA. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Scand J Dent Res*. 1977;85:387–91.
206. Rölla G, Iversen OJ, Bonesvoll P. Lipoteichoic acid - the key to the adhesiveness of sucrose grown *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol*. 1978;107:607–17.
207. Abu-Lail NI, Camesano TA. Role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. *Environ Sci Technol*. 2003;37:2173–83.
208. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:66–77.
209. Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16:783–93.
210. Lamont RJ, Hersey SG, Rosan B. Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7:193–7.
211. Dalton HM, March PE. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr Opin Biotechnol*. 1998;9:252–5.
212. Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci*. 2008;18:1049–56.
213. Hori K, Matsumoto S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem Eng J*. 2010;48:424–34.

214. Veerachamy S, Yarlagadda T, Manivasagam G, Yarlagadda PKD V. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proc Inst Mech Eng Part H J*. 2014;228:1083–99.
215. Gallo J, Holinka M, Moucha CS. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int J Mol Sci*. 2014;15:13849.
216. Sivasankar S, Subramaniam S, Leckband D. Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:12961–6.
217. Nguyen TT, Sly KL, Conboy JC. Comparison of the energetics of avidin, streptavidin, neutrAvidin, and anti-biotin antibody binding to biotinylated lipid bilayer examined by second-harmonic generation. *Anal Chem*. 2012;84:201–8.
218. Wolny PM, Spatz JP, Richter RP. On the adsorption behavior of biotin-binding proteins on gold and silica. *Langmuir*. 2010;26:1029–34.
219. Green NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*. 1990;184:51–67.
220. Green NM. Avidin. *Adv Protein Chem*. 1975;29:85–133.
221. Pasche S, Vörös J, Griesser HJ, Spencer ND, Textor M. Effects of ionic strength and surface charge on protein adsorption at PEGylated surfaces. *J Phys Chem B*. 2005;109:17545–52.
222. Tanaka M, Hayashi T, Morita S. The roles of water molecules at the biointerface of medical polymers. *Polym J. The Society of Polymer Science*, 2013;45:701–10.
223. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, Gennes PG. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide. *J Colloid Interface Sci*. 1991;142:149–58.
224. Crisp SERH, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, Zemleni J. Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr*. 2004;43:23–31.
225. Mengin-Lecreux D, Flouret B, van Heijenoort J. Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1982;151:1109–17.
226. Ettelt V, Ekat K, Kämmerer PW, Kreikemeyer B, Eppe M, Veith M. Streptavidin-coated surfaces suppress bacterial colonisation by inhibiting non-specific protein adsorption. *J Biomed Mater Res Part A* - in press. 2017;
227. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*. 2013;34:8533–54.
228. Vasilev K, Cook J, Griesser HJ. Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert Rev Med Devices*. 2009;6:553–67.
229. Visai L, Nardo L, Punta C, Melone L, Cigada A, Imbriani M, Arciola CR. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. *Int J Artif Organs*. 2011;34:929–46.
230. Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J. Periprosthetic joint infection increases the risk of one-year mortality. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95:2177–84.
231. Dale H, Hallan G, Espehaug B, Havelin LI, Engesaeter LB. Increasing risk of revision due to deep infection after hip arthroplasty. *Acta Orthop*. 2009;80:639–45.
232. Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty*. 2012;27:61–5.e1.
233. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater*. 2012;2:176–94.
234. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:277–81.
235. Hasan J, Crawford RJ, Ivanova EP. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends Biotechnol*. 2013;31:295–304.
236. Axworthy DB, Reno JM, Hylarides MD, Mallett RW, Theodore LJ, Gustavson LM, Su F-M, Hobson LJ, Beaumier PL, Fritzberg AR. Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:1802–7.

- 237. Weiden PL, Breitz HB, Press O, Appelbaum JW, Bryan JK, Gaffigan S, Stone D, Axworthy D, Fisher D, Reno J. Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results. *Cancer Biother Radiopharm.* 2000;15:15–29.
- 238. Grana C, Chinol M, Robertson C, Mazzetta C, Bartolomei M, Cicco C, Fiorenza M, Gatti M, Caliceti P, Paganelli G. Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: a pilot study. *Br J Cancer.* 2002;86:207–12.
- 239. Paganelli G, Orecchia R, Jereczek-Fossa B, Grana C, Cremonesi M, Braud F, Tradati N, Chinol M. Combined treatment of advanced oropharyngeal cancer with external radiotherapy and three-step radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med.* 1998;25:1336–9.
- 240. Paganelli G, Grana C, Chinol M, Cremonesi M, Cicco C, Braud F, Robertson C, Zurrida S, Casadio C, Zoboli S, Siccaldi AG, Veronesi U. Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med.* 1999;26:348–57.
- 241. Paganelli G, Chinol M, Maggiolo M, Sidoli A, Corti A, Baroni S, Siccaldi AG. The three-step pretargeting approach reduces the human anti-mouse antibody response in patients submitted to radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med.* 1997;24:350–1.
- 242. Boerman OC, van Schaijk FG, Oyen WJG, Corstens FHM. Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step. *J Nucl Med.* 2003;44:400–11.
- 243. Paganelli G, Bartolomei M, Ferrari M, Cremonesi M, Broggi G, Maira G, Sturiale C, Grana C, Prisco G, Gatti M, Caliceti P, Chinol M. Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: phase I study and preliminary therapeutic results. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001;16:227–35.
- 244. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album Limber*. *Eur J Biochem.* 1974;47:91–7.
- 245. Muller A, Hinrichs W, Wolf WM, Saenger W. Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution. *J Biol Chem.* 1994;269:23108–11.
- 246. Bayer EA, Ben-Hur H, Hiller Y, Wilchek M. Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochem J.* 1989;259:369–76.
- 247. Schechter B, Arnon R, Colas C, Burakova T, Wilchek M. Renal accumulation of streptavidin: potential use for targeted therapy to the kidney. *Kidney Int.* 1995;47:1327–35.
- 248. Gonzalez M, Bagatolli LA, Echabe I, Arrondo JL, Argarana CE, Cantor CR, Fidelio GD. Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding. *J Biol Chem.* 1997;272:11288–94.
- 249. Gonzalez M, Argarana CE, Fidelio GD. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng.* 1999;16:67–72.
- 250. Spinke J, Liley M, Guder HJ, Angermaier L, Knoll W. Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir.* 1993;9:1821–5.
- 251. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1999;287:103–15.
- 252. Keller S, Nickel J, Zhang J-L, Sebald W, Mueller TD. Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:481–8.
- 253. Sebald W, Nickel J, Zhang J-L, Mueller TD. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem.* 2004;385:697–710.
- 254. Kotzsch A, Nickel J, Seher A, Heinecke K, van Geersdaele L, Herrmann T, Sebald W, Mueller TD. Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome. *J Biol Chem.* 2008;283:5876–87.
- 255. Allendorph GP, Vale WW, Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:7643–8.
- 256. Weber D, Kotzsch A, Nickel J, Harth S, Seher A, Mueller U, Sebald W, Mueller TD. A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol.* 2007;7:6.
- 257. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell.* 1993;73:421–4.

258. Uludag H, Golden J, Palmer R, Wozney JM. Biotinated bone morphogenetic protein-2: In vivo and in vitro activity. *Biotechnol Bioeng.* 1999;65:668–72.
259. Heinecke K, Seher A, Schmitz W, Mueller TD, Sebald W, Nickel J. Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol.* 2009;7:59.
260. Rao S V., Anderson KW, Bachas LG. Determination of the extent of protein biotinylation by fluorescence binding assay. *Bioconjug Chem.* 1997;8:94–8.
261. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Proteomics Protoc Handb.* Totowa, NJ: 2005.
262. Ahn M, Genst E, Kaminski Schierle GS, Erdelyi M, Kaminski CF, Dobson CM, Kumita JR. Analysis of the native structure, stability and aggregation of biotinylated human lysozyme. *PLoS One.* 2012;7:e50192.
263. Jones AL, Buchholz R, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, Pollak AN, Golden JD, Valentin-Opran A. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects: a randomized, controlled trial. *J Bone Jt Surg.* 2006;88:1431.
264. Spinke J, Liley M, Guder HJ, Angermaier L, Knoll W. Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir.* 1993;9:1821–5.
265. Schmidt A, Spinke J, Bayerl T, Sackmann E, Knoll W. Streptavidin binding to biotinylated lipid layers on solid supports. A neutron reflection and surface plasmon optical study. *Biophys J.* 1992;63:1385–92.
266. Cheung JWC, Walker GC. Immuno-atomic force microscopy characterization of adsorbed fibronectin. *Langmuir.* 2008;24:13842–9.
267. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987;238:491–8.
268. Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BAJ. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Jt Surg.* 2003;85:34–8.
269. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277:5330–8.
270. Migliorini E, Valat A, Picart C, Cavalcanti-Adam EA. Tuning cellular responses to BMP-2 with material surfaces. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;27:43–54.
271. Lai C-F, Cheng S-L. Alphavbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2005;20:330–40.
272. Jikko A, Harris SE, Chen D, Mendrick DL, Damsky CH. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1075–83.
273. Valera E, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Choe S. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2010;5:e11167.
274. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors.* 1996;13:291–300.
275. Zimmerman LB, Jesús-Escobar JM, Harland RM. The spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell.* 1996;86:599–606.
276. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Izpisua Belmonte JC, Choe S. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 2002;420:636–42.
277. McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan C-M, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* 1998;12:1438–52.
278. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 2000;28:713–26.

- 279. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol.* 1994;158:555–72.
- 280. Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J.* 1995;15:118–40.
- 281. Moss DW. Aspects of the relationship between liver, kidney and bone alkaline phosphatases. *Prog Clin Biol Res.* 1984;166:79–86.
- 282. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* 1991;14:27–40.
- 283. Fedarko NS, Bianco P, Vetter U, Robey PG. Human bone cell enzyme expression and cellular heterogeneity: Correlation of alkaline phosphatase enzyme activity with cell cycle. *J Cell Physiol.* 1990;144:115–21.
- 284. Heersche JN, Reimers SM, Wrana JL, Wayne MM, Gupta AK. Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts and odontoblasts at different stages of maturity as shown by in situ hybridization. *Proc Finn Dent Soc.* 1992;88 Suppl 1:173–82.
- 285. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol.* 1994;166:220–34.
- 286. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:137–46.
- 287. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol.* 2013;228:1149–53.
- 288. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* 2015;
- 289. Morris AH, Kyriakides TR. Matricellular proteins and biomaterials. *Matrix Biol.* 2014;37:183–91.
- 290. Ribeiro N, Sousa SR, Brekken RA, Monteiro FJ. Role of SPARC in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. *J Cell Biochem.* 2014;115:17–26.
- 291. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981;26:99–105.
- 292. Omar A. Ibrahim, Fuming Zhang, Sybil C. Lang Hrstka, Moosa Mohammadi A, Robert J. Linhardt. Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry.* 2004;43:4724–30.
- 293. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M. Crystal structure of a ternary FGF2-FGFR1-heparin complex. Protein Data Bank, Rutgers University;
- 294. Platonova N, Miquel G, Chiu L-Y, Taouji S, Moroni E, Colombo G, Chevet E, Sue S-C, Bikfalvi A. Dimerization capacities of FGF2 purified with or without heparin-affinity chromatography. Facchiano A editor. *PLoS One.* 2014;9:e110055.
- 295. Lammers G, van de Westerlo EM, Versteeg EM, van Kuppevelt TH, Daamen WF. A comparison of seven methods to analyze heparin in biomaterials: quantification, location, and anticoagulant activity. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17:669–76.
- 296. Kitagawa Y, Ago H, Katsube Y, Fujishima A, Matsuura Y. Crystal structure of basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution. Protein Data Bank, Rutgers University;
- 297. Eriksson AE, Cousens LS, Matthews, BW. Refinement of the structure of human basic fibroblast growth factor at 1.6 Å resolution and analysis of presumed heparin binding sites by selenate substitution. *Protein Sci.* Cambridge University Press; 1993;2:1274–84.
- 298. Miller ED, Fisher GW, Weiss LE, Walker LM, Campbell PG. Dose-dependent cell growth in response to concentration modulated patterns of FGF-2 printed on fibrin. *Biomaterials.* 2006;27:2213–21.
- 299. Pieri I, Barritault D. Biotinylated basic fibroblast growth factor is biologically active. *Anal Biochem.* 1991;195:214–9.

300. Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Babu AN, Schindler M, Meiners S. Covalently attached FGF-2 to three-dimensional polyamide nanofibrillar surfaces demonstrates enhanced biological stability and activity. *Mol Cell Biochem.* 2008;309:157–66.
301. Moon KS, Choi EJ, Oh S, Kim S. The effect of covalently immobilized FGF-2 on biphasic calcium phosphate bone substitute on enhanced biological compatibility and activity. *Biomed Res Int.* 2015;2015:742192.
302. Caldwell MA, Garcion E, terBorg MG, He X, Svendsen CN. Heparin stabilizes FGF-2 and modulates striatal precursor cell behavior in response to EGF. *Exp Neurol.* 2004;188:408–20.
303. Maegawa N, Kawamura K, Hirose M, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H. Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:306–13.
304. Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H, Kawai S, Liang CT. Effects of basic fibroblast growth factor on osteoblast-related gene expression in the process of medullary bone formation induced in rat femur. *J Bone Miner Metab.* Springer-Verlag; 2003;21:74–9.
305. Zellin G, Linde A, Hardwick R, Linde A, Wozney J., Wang E., Ikada Y, Matsumoto T, Koike T. Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis in vivo. *Bone.* 2000;26:161–8.
306. Marie PJ, Miraoui H, Sévère N. FGF/FGFR signaling in bone formation: Progress and perspectives. *Growth Factors.* 2012;30:117–23.
307. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene.* 2003;316:23–32.
308. Blumenthal NC, Betts F, Posner AS. Effect of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite. *Calcif Tissue Res.* 1975;18:81–90.
309. Burke EM, Lucas LC. Dissolution kinetics of calcium phosphate coatings. *Implant Dent.* 1998;7:323–30.
310. Yang Y, Agrawal CM, Kim K, Martin H, Schulz BK, Bumgardner JD, Ong JL, Schulz K. Characterization and dissolution behavior of sputtered calcium phosphate coatings after different postdeposition heat treatment temperatures. *J Oral Implantol.* 2003;29:270–7.
311. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J Biomed Mater Res.* 1990;24:721–34.
312. Kuroda K, Okido M. Hydroxyapatite coating of titanium implants using hydroprocessing and evaluation of their osteoconductivity. *Bioinorg Chem Appl.* 2012;2012:1–7.
313. Weng J. Formation and characteristics of the apatite layer on plasma-sprayed hydroxyapatite coatings in simulated body fluid. *Biomaterials.* 1996;18.
314. Clères L, Fernández-Pradas J., Morenza J. Behavior in simulated body fluid of calcium phosphate coatings obtained by laser ablation. *Biomaterials.* 2000;21:1861–5.
315. Chin JT, Wheeler SL, Klibanov AM. On protein solubility in organic solvent. *Biotechnol Bioeng.* 1994;44:140–5.
316. Pace CN, Treviño S, Prabhakaran E, Scholtz JM. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004;359:1225.
317. Tjernberg A. DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen.* 2005;11:131–7.
318. Lovelock JE, W. BM. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature.* 1959;183:1394–5.
319. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep.* 1994;14:259–81.
320. Canham LT, Reeves CL. Apatite nucleation on low porosity silicon in acellular simulated body fluids. *MRS Proc.* 1995;414:171.
321. Liberatore FA, Geist C, Ng S, Casto S. High capacity, detergent resistant, covalent coated streptavidin FlashPlate® PLUS. 1999.
322. Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* 2001;409:241–6.

323. Knubovets T, Osterhout JJ, Klivanov AM. Structure of lysozyme dissolved in neat organic solvents as assessed by NMR and CD spectroscopies. *Biotechnol Bioeng.* 1999;63:242–8.
324. Bhattacharjya S, Balaram P. Effects of organic solvents on protein structures: Observation of a structured helical core in hen egg-white lysozyme in aqueous dimethylsulfoxide. *Proteins Struct Funct Genet.* 1997;29:492–507.
325. Das DK, Patra A, Mitra RK. Preferential solvation of lysozyme in dimethyl sulfoxide/water binary mixture probed by terahertz spectroscopy. *Biophys Chem. Elsevier B.V.*; 2016;216:31–6.
326. Voets IK, Cruz W a, Moitzi C, Lindner P, Arêas EPG, Schurtenberger P. DMSO-induced denaturation of hen egg white lysozyme. *J Phys Chem B.* 2010;114:11875–83.
327. Rariy R V, Klivanov a M. Correct protein folding in glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13520–3.
328. Roy S, Jana B, Bagchi B. Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme. *J Chem Phys.* 2012;136.
329. Kim J, Clark DS, Dordick JS. Intrinsic effects of solvent polarity on enzymic activation energies. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67:112–6.
330. Olsson MHM, Parson WW, Warshel A. Dynamical contributions to enzyme catalysis: Critical tests of a popular hypothesis. *Chem Rev.* 2006;106:1737–56.
331. Yadav a, Jackson RM, Holbrook JJ, Warshel a. Role of solvent reorganization energies in the catalytic activity of enzymes. *J Am Chem Soc.* 1991;113:4800–5.
332. Roca M, Liu H, Messer B, Warshel A. On the relationship between thermal stability and catalytic power of enzymes. *Biochemistry.* 2007;46:15076–88.
333. Weber P, Ohlendorf D, Wendoloski J, Salemme F. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science.* 1989;243.
334. Eliaz N, Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials.* 2017;10.
335. D'Andrea SC, Fadeev AY. Covalent surface modification of calcium hydroxyapatite using n-alkyl- and n-fluoroalkylphosphonic acids. *Langmuir.* 2003;19:7904–10.
336. Tanizawa Y, Suzuki T. Effects of silicate ions on the formation and transformation of calcium phosphates in neutral aqueous solutions. *J Chem Soc Faraday Trans. The Royal Society of Chemistry;* 1995;91:3499.
337. Hanawa T, Ota M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. *Biomaterials.* 1991;12:767–74.
338. Demri B, Muster D. XPS study of some calcium compounds. *J Mater Process Technol.* 1995;55:311–4.
339. Hollinger G. Structures chimique et electronique de l'interface SiO₂-Si. *Appl Surf Sci.* 1981;8:318–36.
340. Laibinis PE, Bain CD, Whitesides GM. Attenuation of photoelectrons in monolayers of n-alkanethiols adsorbed on copper, silver, and gold. *J Phys Chem.* 1991;95:7017–21.
341. Baur WH. Silicon-oxygen bond lengths, bridging angles Si-O-Si and synthetic low tridymite. *Acta Crystallogr Sect B.* 1977;33:2615–9.
342. Neumeier M, Hails LA, Davis SA, Mann S, Epple M. Synthesis of fluorescent core-shell hydroxyapatite nanoparticles. *J Mater Chem.* 2011;21:1250–4.
343. Johnson WA, Mehl RF. Reaction kinetics in processes of nucleation and growth. *Trans Am Inst Min Metall Eng.* 1939;135:416–458.
344. Avrami M. Kinetics of phase change. III: Granulation, phase change and microstructure. *J Chem Phys.* 1941;9:177–84.

PUBLIKATIONEN

1. Ettelt V, Ekat K, Kämmerer PW, Kreikemeyer B, Epple M, Veith M. Streptavidin-coated surfaces suppress bacterial colonisation by inhibiting non-specific protein adsorption. *J Biomed Mater Res Part A* 106A, 758-768, 2018;
2. Ettelt V, Belitsky A, Lehnert M, Loidl-Stahlhofen A, Epple M, Veith M. Enhanced selective cellular proliferation by multi-biofunctionalisation of medical implant surfaces with heterodimeric BMP-2/6, fibronectin and FGF-2. Submitted to *J Biomed Mater Res A*. 2018;
3. Ettelt V, Leushacke S, Anagreh K, Lehnert M, Epple M, Veith M. Biofunctionalisation of ultra-thin magnetron sputtered calcium phosphate model surfaces. To be submitted to *Langmuir*. 2018;
4. Ettelt V, Ekat K, Epple M, Veith M. A molecular architecture for the selective suppression of bacterial adsorption and the promotion of specific cell adhesion. *BioNanoMaterials*- in press. 2017;
5. Ettelt V, Kämmerer P, Epple M, Veith M. Biofunktionalisierung von Titanimplantaten mit einem Multilayersystem aus BMP-2 und Fibronektin. *BioNanoMaterials*. 2016;17:28–9.

Präsentationen und Poster

1. 1st Young Researcher Academy MedTech Symposium, Universität Duisburg-Essen, Duisburg, 08.04.2016, Ettelt V, Epple M, Veith M. *Biofunctionalisation of titanium implants with streptavidin and biotinylated BMP-2*. (Vortrag)
2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Aachen, 29.09-01.10.2016, Ettelt V, Kämmerer P, Epple M, Veith M. *Biofunktionalisierung von Titanimplantaten mit einem Multilayersystem aus BMP-2 und Fibronektin*. (Vortrag)
3. Kooperationstreffen der Westfälischen Hochschule, Gelsenkirchen, 27.04.2016, Ettelt V, Kämmerer P, Epple M, Veith M. *Biofunktionalisierte medizinische Implantate mit Adhäsionsproteinen und Wachstumsfaktoren zur Unterkieferrekonstruktion*. (Vortrag und Poster)
4. NRW Nano Conference, Münster, 07-08.12.2016, Ettelt V, Epple M, Veith M. *Biofunctional supramolecular architectures with streptavidin, biotinylated fibronectin, and BMP-2 variants for medical implants*. (Poster)
5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Würzburg, 08.11-11.11.2017, Ettelt V, Ekat K, Epple M, Veith M. *A molecular architecture for the selective suppression of bacterial adsorption and the promotion of specific cell adhesion*. (Vortrag)

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

DANKSAGUNG

Es ist mir ein Anliegen, an dieser Stelle den Leuten zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen oder das Ganze erst ermöglicht haben.

An erster Stelle danke ich **Prof. Dr. Matthias Epple** für die Möglichkeit, kooperativ in seinem Lehrstuhl das Thema zu bearbeiten. Darüber hinaus für die Möglichkeit, Tagungen zu besuchen und nicht zuletzt für die exzellente Betreuung und den regelmäßigen, hilfreichen Austausch.

Für die Zweitbetreuung möchte ich **Prof. Dr. Michael Veith** danken, der überhaupt erst die Voraussetzung dafür geschaffen hat, dass dieses Thema bearbeitet werden konnte. Die geopfert Zeit, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Unterstützung in jeder Hinsicht sind einen besonderen Dank wert!

Für den Vorsitz beim Promotionsverfahren möchte ich mich bei **PD Dr. Ursula Telgheder** bedanken.

Bei der experimentellen Arbeit sind viele Helfer zu erwähnen:

- **Gabi Herrmann** vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz danke ich für das Sputtern der vielen Modelloberflächen,
- **Dr. Jutta Goldschmitt** für die Möglichkeit, im Labor für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz Zellkulturversuche mit Osteoblasten durchzuführen und darüber hinaus für die hilfreiche Beratung in vielen fachspezifischen Punkten,
- **Dr. med. Dr. med. dent. Peer Kämmerer** für die vielen Anregungen und Möglichkeiten, an der Universitätsmedizin in Rostock mikrobiologische S2-Untersuchungen durchzuführen,
- **MSc. Katharina Ekat** für die aufopfernde Hilfe bei mikrobiologischen Untersuchungen und den vielen guten Gesprächen in Rostock,
- **Dr. Katheryna Loza** für die REM-Aufnahmen,
- **BSc. Khaled Anagreh** für seine Unterstützung bei den AFM-Aufnahmen,

- der AG Medizinische Massenspektrometrie von **Prof. Dr. Klaus Dreisewerd** für die Möglichkeit, massenspektrometrische Untersuchungen durchzuführen, insbesondere **MSc. Andreas Schnapp**,
- **Prof. Dr. Franziska Träger** für die Hilfe bei der Auswertung und Diskussion der XPS-Messungen, sowie dem Helmholtz-Zentrum in Berlin mit **Prof. Dr. Kovacevic** für die Möglichkeit, dort XPS-Aufnahmen zu machen.

Besonderer Dank gilt auch den vielen Studenten und Absolventen, die ihre Abschlussarbeit in der AG Biophysik geschrieben haben oder eine Laborpraxis thematisch nahe an der Promotion durchgeführt haben:

- | | | |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| • Felix Braczko | • Alice Belitzky | • Rainer Ettelt |
| • Daniel Sieme | • Stefan Leushacke | • Raphael Konopatzki |
| • Khaled Anagreh | • Dennis Wohlgemuth | • Moritz Berner |
| • Marie Theiß | • Lukas Dohmen | • Mike Blüggel |
| • Karina Jasinski | • Simona Matzke | • Anna Göhring |

Bei der wissenschaftlichen Hilfestellung möchte ich zudem **Prof. Dr. Andreas Beyer** und **Prof. Dr. Angelika Loidl-Stahlhofen** dankend erwähnen, die an entscheidenden Punkten wertvolle Ratschläge geben konnten.

Für motivatorische Unterstützung danke ich meinem Büropartner **MSc. David Bittner** sowie dem ganzen Mitarbeiterstab der WHS. Ebenso gilt der Dank der ganzen AG Anorganische Chemie des AK Epple.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner **Familie**. Der Rückhalt, den ich von ihr bekomme, ist ein Geschenk.

Am meisten danke ich meiner lieben **Betty**, ohne die ich das alles nicht geschafft hätte. Ihre Geduld und Hilfe während der gesamten Arbeit, die vielen Korrekturen sowie der Verzicht in den stressigen Phasen sind nicht in Worte zu fassen.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Biofunktionalisierung von Implantat-Modelloberflächen mit Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteinen“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Recklinghausen, 19. Dezember 2017

Volker Ettelt